نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 8، شماره 3، پاییز 1395، ص. 529-520

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 8, No. 3, Fall 2016, p. 520-529

اثر محافظتی پودر زردچوبه (*Curcuma longa*) بر آسیب‌های ناشی از استات سرب بر مصرف خوراک، تغییرات وزن و عملکرد تولید مثلی رت‌های نر ویستار

علیرضا ایوبی[1*] - رضا ولی‌زاده[2]- آرش امیدی[3]- عاطفه بابایی[4]

تاریخ دریافت: 1392/08/25
تاریخ پذیرش: 1394/07/18

چکیده

به‌منظور بررسی اثرات محافظتی پودر زردچوبه بر عوارض ناشی از سرب بر بافت بیضه و تغییرات هورمون تستوسترون در رت‌ها، تعداد 32 سر رت نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی به چهار گروه هشت تایی شامل گروه‌های 1) شاهد، 2) شاهد دیابتی (تزریق 55 میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین)، 3) دیابتی دریافت‌کننده سرب (تزریق 55 میلی‌گرم بر کیلوگرم، استرپتوزوتوسین و100میلی‌گرم بر کیلوگرم استات سرب محلول در آب) و 4) دیابتی دریافت‌کننده سرب همراه با پودر زردچوبه (تزریق 55 میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین، 100 میلی‌گرم بر کیلوگرم استات سرب محلول در آب، به‌علاوه پودر زردچوبه به‌مقدار 2درصد خوراک)، اختصاص داده شدند. طول دوره آزمایش چهار هفته بود و مقدار خوراک مصرفی و اضافه وزن روزانه اندازه‌گیری شد. در روز 29 آزمایش نمونه‌گیری بافتی از بیضه راست و خون‌گیری از قلب تمام رت‌ها انجام شد. آسیب بیضه‌ای با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین بررسی شد. مصرف خوراک و وزن زنده در رت‌های دیابتی نسبت به رت‌های شاهد کاهش یافت. این کاهش در رت‌های دیابتی دریافت‌کننده استات سرب بیشتر بود، ولی اضافه شدن پودر زردچوبه روند مصرف خوراک را به‌طور معنی‌دار کاهش داد. ضخامت لایه‌های سلولی و تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت و سرتولی در رت‌های دیابتی دریافت‌کننده سرب نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. میزان هورمون تستوسترون در تیمارهای دیابتی و سرب‌دار نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت، اما تیمار دارای پودر زردچوبه سبب افزایش غلظت هورمون تستوسترون شد. حدس زده می‌شود که وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در پودر زردچوبه چون کورکومین می‌تواند از بروز برخی عوارض اکسیداتیو سرب در رت‌ها و بیماران دیابتی در جوامع انسانی بکاهد.

واژه‌های کلیدی: بافت بیضه، تستوسترون، دیابت، رت ویستار، زردچوبه، سرب.

مقدمه

دیابت قندی با اختلال در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها منجر به افزایش قند خون می شود، و باعث صدمه به اندام‌هایی نظیر چشم، کلیه، سیستم عصبی، قلبی و عروقی می‌گردد (30). دیابت به 2 نوع تقسیم شده است؛ نوع یک که از کمبود انسولین ناشی می‌شود و دیابت نوع 2 که در نتیجه مقاومت بافتی نسبت به انسولین بروز می‌یابد (7). مطالعات نشان داده که استرس اکسیداتیو یکی از علل اصلی تغییرات دژنراتیو مزمن در دیابت است و تیمار با آنتی‌اکسیدان‌ها سبب کاهش برخی عوارض دیابت می‌شود (14). علاوه‌بَراین مطالعاتی مبنی بر تأثیرات دیابت بر عملکرد و ساختار سیستم تولیدمثل نر نظیر کاهش ترشح تستوسترون، کاهش میل جنسی (25)، تحلیل غدد ضمیمه تولیدمثلی (6)، کاهش حرکت اسپرم (5)، کاهش شمار اسپرم و افزایش اسپرم‌های ناهنجار گزارش شده است (28). وجود سرب در برخی مواد شیمیایی صنعتی، سبب آلودگی محیط زیست و ایجاد خطر برای انسان و سایر موجودات می‌شود (29). با این‌که در بسیاری از کشورها سرب از سوخت‌هایی چون بنزین حذف گردیده است، با این‌وجود میزان سرب بدن افراد در چنین جوامعی بیشتر از حد مجاز است (12). سرب از طریق دستگاه گوارش و سیستم تنفسی جذب بدن شده و پس از انتقال از طریق خون و رسوب کردن در بافت‌های بدن نظیر کلیه، کبد، طحال، دستگاه اعصاب مرکزی، مغز استخوان و سیستم تولیدمثلی، سبب اختلال در عملکرد اعضای مذکور به‌دلیل اثرات اکسیداسیون می‌شود (16). گیاهان دارویی به‌دلیل دارابودن برخی ترکیبات ویژه از جمله

1- دانشجوی دکتری فیزیولوژی دام دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران،
2- استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد،
3- دانشیار گروه مدیریت بهداشت دام، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز،
4- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.
(*- نویسنده مسئول: (Email: ayyoubi.ar@gmail.com
DOI: 10.22067/ijasr.v0i0.28227

پلی‌فنل‌ها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بالایی هستند (8 و 23). گیاه زردچوبه با نام علمی *Curcuma longa* در بسیاری از مناطق گرمسیری آسیا از جمله هند و چین می‌روید. کورکومین موجود در زردچوبه به‌عنوان یکی از ترکیبات فعال، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی (17)، ضدالتهاب، سرطان (9) و میکروبی عمل می‌کند (19) و دارای اثرات ضد دیابتی نیز هست (23). از طرفی زردچوبه فعالیت سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز را در سلول‌های اندوتلیال عروق در محیط کشت افزایش می‌دهد. گزارش شده که خاصیت آنتی اکسیدانی زردچوبه سبب بهبود عملکرد کلیه و کبد در رت‌های مبتلا به دیابت شده است (26). با توجه به اثرات مضر ایجاد شده توسط استرپتوزتوسین و سرب، این مطالعه جهت بررسی اثر محافظتی زردچوبه بر غلظت هورمون تستوسترون و هیستوپاتولوژی بیضه در رت‌های دیابتی نر ویستار انجام شد.

مواد و روش‌ها

حیوانات و تیمارها

تعداد 32 سر رت سفید نژاد ویستار با میانگین وزن اولیه 1/8±182/6 گرم، تحت چرخه نوری 12ساعت تاریکی و 12ساعت روشنایی و رطوبت 45-35درصد و با درجه حرارت 25-23°C در مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و درون قفس‌های مخصوص نگهداری شدند. در این قفسه‌ها رت‌ها آزادانه به غذا و آب دسترسی داشتند. رت‌ها به‌طور تصادفی به یکی از چهار تیمار آزمایشی زیر اختصاص داده شدند. تیمارهای آزمایشی شامل: 1) شاهد (سالم)، 2) شاهد دیابتی (تزریق 55 میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین)، 3) دیابتی حاوی سرب (تزریق 55 میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین، به‌علاوه 100میلی‌گرم بر کیلوگرم استات سرب محلول در آب) و 4) دیابتی حاوی سرب به‌علاوه زرد چوبه (تزریق 55 میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین، 100میلی‌گرم بر کیلوگرم استات سرب محلول در آب به‌علاوه 2درصد خوراک زردچوبه)، بود.

ایجاد دیابت

به‌منظور ایجاد دیابت از استرپتوزوتوسین (*STZ*)[1] ساخت شرکت سیگما (آمریکا) استفاده شد. قبل از تزریق، پودر *STZ* در محلول بافر سدیم سیترات با pH= 4/5 حل و (به‌میزان 55 میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به‌درون صفاق رت‌ها که به‌مدت 12ساعت به غذا دسترسی نداشتند، تزریق شد (27). پس از گذشت 72 ساعت بعد از تزریق، و برای اطمینان از دیابتی شدن، خون‌گیری از ناحیه چشم رت‌ها انجام شد. رت‌هایی که میزان قند خون آن‌ها بیشتر از 300 میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود، به‌عنوان دیابتی در نظر گرفته شد.

نمونه‌گیری از خون و بافت بیضه

طول دوره‌ی آزمایش چهار هفته بود و در روز 29 آزمایش حیوانات توسط مخلوطی از کتامین (100 میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گزیلازین (10میلی‌گرم بر کیلوگرم) دچار بیهوشی عمیق شدند و خون‌گیری مستقیم از قلب آن‌ها انجام گرفت. خون حاصله به‌مدت 15دقیقه در 3000 دور سانتریفیوژ شد و پس از جداسازی سرم در دمای 20-درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. برای توزین و نمونه‌گیری از بیضه‌ها یک برشی طولی در شکم و کیسه بیضه انجام شد و بیضه‌ها با پنس خارج گردید و با ترازوی دیجیتال با دقت 0/001گرم وزن شد. بیضه‌ها ابتدا به قطعات 5×5 میلی‌متر از طول تقسیم شد و بلافاصله در محلول فرمالین 10درصد قرار گرفت تا برای مراحل بعدی و تهیه مقاطع بافتی بیضه و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین آماده گردند (2).

بررسی هیستولوژی واندازه‌گیری غلظت تستوسترون

به‌منظور بررسی هیستولوژی، مقاطع بافتی از بیضه‌های فیکس شده طی مراحل ذیل تهیه شد. نمونه‌ها پس از آب‌گیری و الکل‌زدایی در پارافین قالب‌گیری شد. مراحل شامل: برش بافتی توسط میکروتوم به مقاطع پنج میکرون، انتقال بر روی لام و در نهایت رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین-ائوزین بود. به‌منظور مطالعه بافت بیضه، با استفاده از میکروسکوپ نوری، ابتدا 20 عدد لوله اسپرم‌ساز مدور از مقاطع رنگ‌آمیزی شده بیضه هر موش انتخاب و سپس قطر لوله اسپرم‌ساز، لومن، ضخامت لایه‌های سلولی و تعداد سلول‌های سرتولی و اسپرماتوسیت اندازه‌گیری و ثبت شد. در این مطالعه، اندازه‌گیری غلظت هورمون تستوسترون با استفاده از روش الایزا و کیت تشخیص هورمونی شرکت DRG آلمان انجام شد (3).

آنالیز آماری

تحلیل نتایج به‌دست آمده از این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و با در نظر گرفتن وزن اولیه به‌عنوان متغیر کمکی با رویه *GLM* نرم‌افزار آماری *SAS* انجام شد. مقایسه بین میانگین‌ها با استفاده از آزمون مقایسات چنددامنه‌ای دانکن انجام و حد (P<0/05) به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج تأثیر زردچوبه و استات سرب بر میانگین روزانه مصرف خوراک و تغییرات وزن روزانه رت‌ها در جدول 1 نشان داده شده است.

1- Streptozotocin

نتایج نشان داد که مصرف خوراک در رت‌های دیابتی در مقایسه با گروه شاهد به شکل معنی‌داری (P<0/05) کاهش یافت. کاهش مصرف خوراک سبب کاهش معنی‌دار (P<0/05) وزن زنده در رت‌های اختصاص داده شده به تیمارهای مختلف نیز گردید.

کاهش وزن در رت‌های دیابتی می‌تواند به‌علت کاهش مصرف خوراک و هم‌چنین اثرات ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین باشد. مطابق گزارش اُوو و همکاران (19) رت‌های دیابتی شده در مقایسه با گروه شاهد نرخ متابولیسم پایه بالاتری داشتند. قاعدتاً چنین افزایشی منجر به افزایش تجزیه لیپیدها و پروتئین‌ها می‌گردد و ممکن است در این آزمایش نیز چنین افزایشی در متابولیسم پایه اتفاق افتاده باشد و باعث کاهش وزن زنده رت‌های دیابتی گردیده باشد.

جدول 1- تأثیر تیمارهای مختلف بر مصرف خوراک و افزایش وزن در رت‌های ویستار (گرم در روز)[1]

Table 1- Effect of different treatments on feed intake and weight gain Wistar rats (g day^{-1})[1]

تیمار Treatment	مصرف خوراک[1] Feed intake	افزایش وزن Weight gain
کنترل Control	86.32 ± 3.23^{a}	2.28 ± 0.14^{a}
دیابتی Diabetic	54.47 ± 3.6^{b}	0.86 ± 0.19^{b}
دیابتی با استات سرب Diabetic with lead acetate	48.01 ± 4.2^{c}	0.51 ± 0.16^{c}
دیابتی با استات سرب و پودر زردچوبه Diabetic with lead acetate and turmeric powder	52.18 ± 3.5^{b}	0.53 ± 0.17^{c}

[1] میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P <0/05).

[1] Mean with different alphabets are statistically different (P< 0.05).

نتایج اثرات استات سرب و پودر زردچوبه بر اسپرماتوژنز و سطح تستوسترون خون در رت‌ها، در جدول 2 آمده است. نتایج نشان داد که قطر لوله‌های سمینیفر در تیمارهای دیابتی نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری (P<0/05) افزایش یافته است. هم‌چنین نتایج بررسی بافتی یک روند افزایشی در قطر لومن را نشان می‌دهد به‌نحوی که تیمارهای دیابتی تفاوت معنی‌داری (P<0/05) با تیمار شاهد نشان داد. ضخامت لایه‌های سلولی در رت‌های دیابتی یک روند کاهشی داشت و تفاوت بین تیمارهای دیابتی و شاهد معنی‌دار بود (P<0/05). تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت یک روند کاهشی در رابطه با مسمومیت با سرب در تیمارهای دیابتی نشان داد. به‌طوری‌که تیمارهای حاوی سرب و زردچوبه نسبت به تیمار دیابت و شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد (P<0/05). تعداد سلول‌های سرتولی نیز تحت تأثیر دیابت و سرب یک روند کاهشی را نشان دادند به‌نحوی که تفاوت تیمارهای دیابتی با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (P<0/05). سطح تستوسترون خون تحت تأثیر دیابت و سرب یک روند کاهشی را نشان داد. به‌طوری‌که تفاوت سطح تستوسترون خون در رت‌های دیابتی شده، با رت‌های گروه شاهد تفاوت معنی‌دار نشان داد (P<0/05).

بر اساس نتایج بافت‌شناسی، فعالیت بافت اسپرماتوژنز تحت تأثیر تیمار دیابت قرار گرفت. به‌طوری‌که قطر لوله‌های منی‌ساز و لومن افزایش یافت و تیمارهای دیابتی با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری (P<0/05) نشان داد. ضخامت لایه‌های سلولی دیواره لوله‌های منی ساز تحت تأثیر دیابت روند کاهشی داشت اما این کاهش در رت‌های اختصاصی به تیمار حاوی پودر زردچوبه کمتر بود. کاهش ضخامت لایه‌های سلولی لوله‌های منی‌ساز در رت‌های دیابتی می‌تواند بر عملکرد تولیدمثلی و تولید اسپرم و محلول‌های همراه تأثیر بگذارد. افزایش قطر لومن و کاهش ضخامت لایه‌های سلولی دیواره لوله‌های منی‌ساز احتمالاً به‌دلیل اثرات اکسیداسیون سرب از طریق افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در بافت بیضه بوده است.

گزارش شده است که تستوسترون دارای اثرات آنابولیک مستقیم بر ساخت پروتئین در تمام اندام‌ها و بافت‌های بدن است، که طبعاً موجب افزایش توده‌های ماهیچه‌ای و استخوانی در جنس نَر می‌شود (10). بنابراین کاهش وزن رت‌ها و ترشح هورمون تستوسترون بدیهی به‌نظر می‌رسد. جهت بررسی تأثیر استات سرب و زردچوبه بر عملکرد تولیدمثلی رت‌های دیابتی، برخی اندام‌های تولیدمثلی نظیر بیضه و اپیدیدیم توزین و نتایج آن در جدول شماره 3 ثبت شده است. وزن بیضه‌ها تحت تأثیر تیمارهای دیابتی روند کاهشی نشان داد؛ اما این کاهش وزن در بین تیمارهای دیابتی و شاهد معنی‌دار نبود. میانگین وزن اپیدیدیم در تیمارهای دیابتی نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت (P<0/05)؛ اما این کاهش در تیمار دیابت-سرب نسبت به تیمارهای دیابت و زردچوبه بیشتر بود؛ به‌نحوی که تیمار دیابت-سرب نسبت به تیمار دیابت و شاهد اختلاف معنی‌دار (P<0/05) نشان داد. در حالت طبیعی، سازوکارهای آنتی‌اکسیدانی در بافت‌های تولیدمثلی حضور دارند و از بروز آسیب اکسیداتیو در فرآیندهای اسپرماتوژنز جلوگیری

می‌کنند (18).

جدول 2- اثر تیمارهای مختلف بر پارامترهای هیستولوژی بافت بیضه در رت‌های ویستار[1]

Table 2- Effect of different treatments on histological parameters of testis tissue in Wistar rats[1]

فراسنجه parameter	تیمار Treatment			
	کنترل Control	دیابتی Diabetic	دیابتی حاوی سرب Diabetic with lead	دیابتی حاوی سرب و زردچوبه Diabetic with lead and turmeric
قطر سمینیفر (µm) Seminiferous diameter (µm)	674.6 ± 17.4[b]	697.3 ± 15.8[b]	732.5 ±19/1[a]	713.4 ± 21.3[a]
قطر لومن (µm) Lumen diameter (µm)	526.3 ± 13.2[b]	547.2 ±14.7[b]	692.3 ±22.6[ab]	683.5 ± 18.6[a]
ضخامت‌لایه سلولی (µm) Cell layer thickness (µm)	217 ± 5.8[a]	169.2 ± 6.4[a]	133.4 ± 7.8[b]	149.3 ± 9.3[c]
سلول اسپرماتوسیت (تعداد) Spermatocytes cell (number)	75.3 ± 2.3[a]	62.5 ± 1.4[a]	43.6 ± 2.6[b]	56.4 ± 2.1[b]
سلول سرتولی (تعداد) Sertoli cell (number)	42.7 ± 0.6[a]	31.8 ± 0.7[b]	23.4 ± 0.5[b]	35.1 ± 0.6[b]
تستوسترون($ng\ l^{-1}$) Testosterone ($ng\ l^{-1}$)	7.3 ± 0.6[a]	3.8 ± 0.6[b]	1.9 ± 0.3[b]	2.8 ± 0.4[b]

[1] میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0/05$).

[1] Mean with different alphabets are statistically different ($P < 0.05$).

مطالعات نشان داده که استات سرب از طریق کاهش و یا مهار فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز (*SOD*) و کاتالاز بیضه‌ای و به‌دلیل تجمع درون سلولی سرب، باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه تخریب لایه‌های سلول‌های تولیدکننده اسپرم و لیدیک می‌شود. در سلول‌های جنسی *SOD* مهم‌ترین سیستم حفاظتی در برابر اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد محسوب می‌شود و مهار آن توسط استات سرب صدمات زیادی بر عملکرد تولیدمثلی می‌گذارد (24). مطالعات کاشل و همکاران (15) نشان داد که تعداد لایه‌های سلولی سمینیفر و اسپرماتیدها تحت تأثیر سطوح مختلف سرب به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. هم‌چنین گزارش شده است که استات سرب سبب آسیب *DNA* و تخریب کروموزومی و کاهش تقسیم سلولی در سلول‌های سوماتیک و جنسی در رت‌ها می‌شود (22). از طرفی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پودر زردچوبه، عصاره‌ها و برخی ترکیبات آن را در شرایط آزمایشگاهی و استفاده از موجود زنده گزارش شده است (26). هم‌چنین گزارش شده که کورکومین موجود در زردچوبه به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی زیاد و باند شدن با سرب سبب کاهش فعالیت رادیکال‌های آزاد و در نتیجه کاهش تخریب بافت بیضه می‌شود (13). پینگ و همکاران (21) گزارش کردند که سرب موجب کاهش تحرک و نفوذ اسپرم به درون تخمک در رت‌ها می‌شود اما تغذیه آن‌ها با ویتامین *C* و *E* به‌دلیل اثرات آنتی‌اکسیدانی که دارند می‌تواند مانع از بروز اثرات مخرب سرب و در نتیجه افزایش تحرک و نفوذ اسپرم به درون تخمک شود. نتایج مطالعات فوق با یافته‌های حاضر مطابقت دارد و آسیب بافت بیضه احتمالاً به‌دلیل تجمع سرب در بافت بیضه و تأثیر آن بر اکسیداسیون غشای سلول‌ها در فرایند اسپرماتوژنز است. تجزیه نتایج مربوط به تعداد سلول‌های سرتولی و تعداد اسپرماتوسیت‌های اولیه نشان داد که تعداد سلول‌های مذکور تحت تأثیر دیابت روند کاهشی داشتند. به‌طوری‌که در رت‌های دیابتی شده کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد. با توجه به اهمیت سلول‌های سرتولی در تقسیم و تمایز سلول‌ها در فرآیند اسپرماتوژنز، کاهش تعداد آن‌ها مانع از روند طبیعی تکامل سلول‌های جنسی نَر می‌گردد. غلظت هورمون تستوسترون در رت‌های تیمار دیابت و دیابت- سرب یک روند کاهشی داشت، اما این کاهش در تیمار زردچوبه احتمالاً به‌دلیل اثرات آنتی‌اکسیدانی زردچوبه کمتر بود.

در این آزمایش دیابت و سرب سبب کاهش میانگین وزن بیضه‌ها در مقایسه با تیمار شاهد شد. این کاهش در رت‌های دیابتی شده حاوی استات سرب چشم‌گیرتر بود. تغییرات وزن اپیدیدیم نیز یک روند کاهشی داشت. مطالعات نشان داده است که رادیکال‌های آزاد به‌دلیل تمایل زیاد به گرفتن الکترون، سبب آسیب دیگر مولکول‌ها ازجمله اسیدهای چرب در غشاهای بیولوژیک و اکسیداسیون آن‌ها می‌شود و نتیجه آن آسیب ساختار و عملکرد غشاء در بیضه می‌باشد (18). گزارش شده است که اندازه‌ی بیضه با تعداد سلول‌های سرتولی و تولید اسپرم مرتبط است به‌طوری‌که اندازه‌ی بیضه منعکس‌کننده‌ی

تعداد سلول‌های زاینده‌ی موجود در آن است (4). از این‌رو می‌توان گفت که افزایش تولید رادیکال‌های آزاد به‌دلیل تجمع سرب در سلول‌های بیضه سبب از بین رفتن بافت بیضه و کاهش وزن آن می‌شود. در این مطالعه نتایج مربوط به سلول‌های سازنده اسپرم نیز روند کاهشی داشت که با کاهش وزن بیضه مطابقت دارد. بررسی آسیب‌شناسی مطالعه‌ی حاضر نشان داد که ایجاد دیابت باعث تغییرات پاتولوژیک در بافت بیضه می‌شود به‌طوری‌که ساختار لوله‌های سمینیفر همراه با بافت اسپرماتوژنز در تیمارهای مختلف متفاوت بود (شکل‌های 1 تا 4) و درمان با زردچوبه، این تغییرات را از طریق حفاظت لوله‌های سمینیفر و جلوگیری از کاهش بافت سلولی دیگر با فرآیند اسپرماتوژنز بهبود بخشید. در بررسی مقاطع بافتی،تغییرات ضخامت لایه‌های سلولی بافت اسپرم ساز، قطر لومن، تجمع توده اسپرم در ناحیه لومن و واپاشی سلولی در لوله‌های سمینیفر در تیمارهای حاوی رت‌های دیابتی شده (شکل‌های 2، 3 و 4) در مقایسه با تیمار کنترل (شکل1) کاملا مشهود بود. از جمله در رت‌های دیابتی مصرف‌کننده سرب تنها دولایه سلول‌های زاینده تولید کننده اسپرم مشاهده شد (شکل 3). مطابق گزارشات منتشر شده، دولایه زاینده در برابر تخریب سموم مستثنی بوده و به‌نظر می‌رسد که این سلول‌ها در مقابل سمیت عناصری چوب سرب و اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد مقاومت بیشتری می‌کنند (7). هم‌چنین تفکیک و جداسازی لایه‌های سلولی مرتبط با فرآیند اسپرماتوژنز، در تیمارهای دیابتی کاملاً مشهود بود، هرچند مقاطع بافتی در رت‌های دیابتی حاوی پودر زردچوبه اثرات تخریبی به‌دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی کورکومین زردچوبه کمتر بود (شکل 4). همین‌طور در بررسی‌های بافتی مشاهده شد که تجمع اسپرم نابالغ در لومن لوله‌های سمینیفر در تیمارهای دیابتی در مقایسه با تیمار شاهد کاهش یافت، به‌طوری‌که حضور اسپرم در لومن لوله‌های سمینیفر تیماردیابت-سرب مشاهده شد (شکل 3). ضخامت دیواره لوله‌های سمینیفر در تیمارهای دیابتی خصوصاً تیمار دیابت-سرب کاهش یافت و منجر به افزایش قطر لومن گردید. این تغییرات می‌تواند بر عملکرد تولیدمثلی و تولید اسپرم تأثیر بگذارد. گزارش شده که تزریق استرپتوزتوسین در دیابت شیرین، تغییرات بافتی بیضه را از طریق ایجاد مرگ سلولی و آپوپتوزیس، آتروفی لوله‌های سمینیفر، کاهش قطر لوله‌ها و کاهش سلول‌های اسپرم‌ساز ایجاد می‌کند (11). اسپرم پستانداران دارای مقادیر بالایی اسیدهای چرب غیراشباع، پلاسمالوژن و اسفنگومیلین است که سوبستراهای مهم در عمل اکسیداسیون به‌شمار می‌روند (1). بر اساس مطالعات انجام شده، استات سرب از طریق افزایش فعالیت رادیکال‌های آزاد به‌دلیل کاهش فعالیت *SOD* و کاتالاز سبب آسیب دیواره سلولی جنسی، گسستگی فرآیند اسپرماتوژنز و کاهش تراکم اسپرم می‌شود (24). این نتایج با یافته‌های این آزمایش در خصوص اثرات محافظتی و آنتی‌اکسیدانی کورکومین موجود در زردچوبه مطابقت دارد.

جدول 3- اثر تیمارهای مختلف بر میانگین وزن (گرم) اندام‌های تولیدمثلی در رت‌های ویستار[1]

Table 3- Effect of different treatments on the average of reproductive organs weight in Wistar rats[1]

تیمارها Treatment	اپیدیدیم Epididymis	بیضه Testis
کنترل Control	0.86 ± 0.01^{a}	1.69 ± 0.03
دیابتی Diabetic	0.53 ± 0.01^{b}	1.13 ± 0.04
دیابتی با استات سرب Diabetic with lead acetate	0.32 ± 0.02^{c}	1.02 ± 0.02
دیابتی با استات سرب و پودر زردچوبه Diabetic with lead acetate and turmeric powder	0.44 ± 0.02^{bc}	1.17 ± 0.03

[1] میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P <0/05).

[1] Mean with different alphabets are statistically different (P< 0.05).

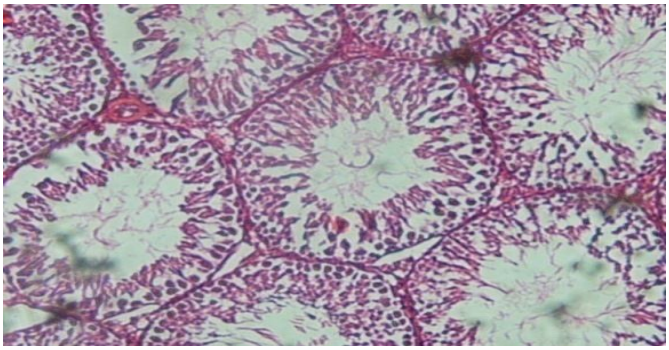
نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج به‌دست آمده از این آزمایش، استات سرب احتمالاً به‌دلیل افزایش اکسیداسیون در بافت بیضه رت‌های دیابتی سبب تخریب لایه‌های سلولی مولد اسپرم و کاهش ترشح تستوسترون شده و اثرات دیابت درکاهش عملکرد تولیدمثلی را تشدید می‌کند. ترکیباتی نظیر کورکومین موجود در زردچوبه می‌تواند سبب جلوگیری از بروز این‌گونه اثرات مخرب سرب شود.

سپاسگزاری

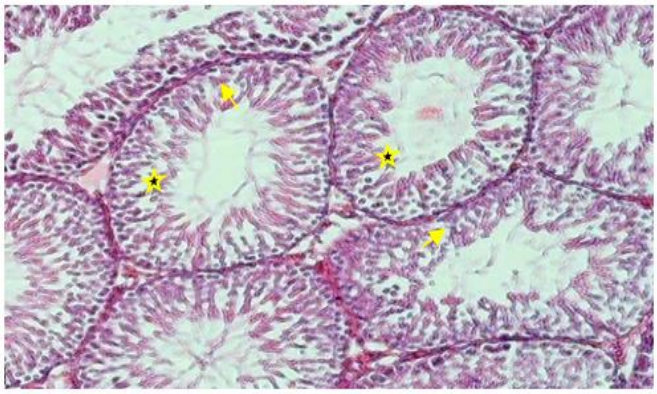
این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد که بدین‌وسیله از مساعدت و همکاری این حوزه در دانشگاه فردوسی مشهد و دانشکده کشاورزی آن تشکر و

قدردانی می‌شود.



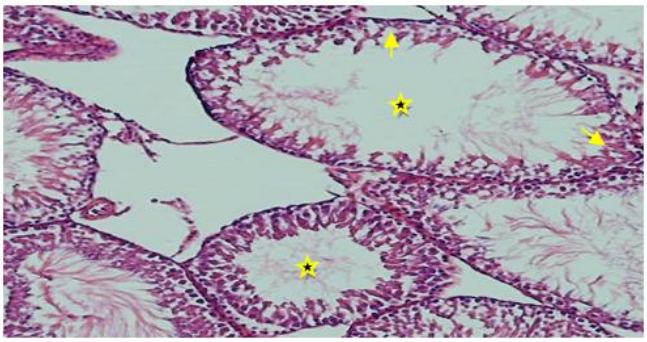
شکل 1- میکروفتوگراف بافت بیضه در تیمار شاهد. منظم بودن لوله‌های سمینیفر، سلول‌های بینابینی و تجمع اسپرم مشهود است (رنگ‌آمیز (H&E) ;X100)

Figure 1- Microphotograph of testis tissue in control treatment. Regular seminiferous tubes, interstitial cells and sperm accumulation is visible. X100; (H&E).



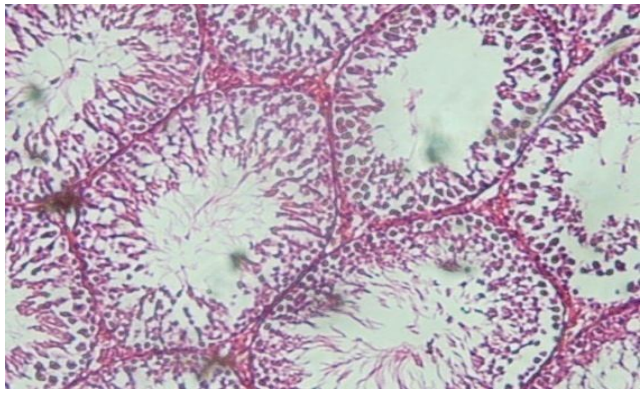
شکل 2- میکروفتوگراف بافت بیضه در تیمار دیابتی. واپاشی لایه‌های سلولی (فلش) و تخریب سلول‌های بینابینی (ستاره) قابل مشاهده است (رنگ‌آمیزی (H&E) ;X100).

Figure 2- Microphotograph of testis tissue in diabetic treatment. Decay cell layers (arrow) and the destruction of interstitial cells (stars) is visible. X100; (H&E).



شکل 3- فتومیکروگراف بافت بیضه در تیمار دیابت-سرب. کاهش چشمگیر ضخامت دیواره سلولی سمینیفر (فلش)، کاهش شدید اسپرم در لومن سمینیفروس (ستاره) و تخریب سلول‌های بینابینی مشهود است (رنگ‌آمیزی (H&E) ;X100).

Figure 3- Microphotograph of testis tissue in diabetic and lead treatment. Significant reduction in seminiferous cell wall thickness (arrow), sharp decline of sperm in lumen of the seminiferous (Star) and destruction of interstitial cells is visible. X100; (H&E).



شکل 4- میکروفتوگراف بافت بیضه در تیمار زردچوبه. تغییرات بافت بیضه و آسیب لایه‌های سلولی نسبت به تیمار دیابت- سرب کمتر است (رنگ‌آمیزی (H&E) ;X100)

Figure 4- Microphotograph of testis tissue in turmeric treatment. Testicular tissue changes and cell layers damage is less than diabetic and lead treatment. X100; (H&E)

منابع

1- Aitken, R. J., J. S. Clarkson and S. Fishel. 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. Biology of Reproduction, 41: 183-97.

2- Arun, N. and N. Nalini. 2002. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. Plant Foods for Human Nutrition, 57: 41-52.

3- Ayoubi, A. R., J. Arshami, R. Valizadeh, Z. Mousavi, and A. Mousayi. 2013. The effect of water-alcholic extracted gum of ferula asafoetida on blood parameters and testis histological in male wistar rat. Iranian Journal of Animal Science Research, 4(4): 310-315. (In Persian with English Abstract).

4- Ayoubi, A. R., R. Valizadeh, J. Arshami and Z. Mousavi. 2014. The effect of water-alcholic extracted gum of ferula asafoetida on body and testes weight, testosterone and spermatogenesis in adult male wistar rat. Iranian Journal of Animal Science Research, 6(2): 173-180. (In Persian with English Abstract).

5- Baccetti, B., A. La Marca, P. Piomboni, S. Capitani, E. Bruni, and F. Petraglia. 2002. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. Human Reproduction, 17: 2673-7.

6- Balasubramanian, K., P. Sivashanmugam, S. Thameemdheen and P. Govindarajulu. 1991. Effect of diabetes mellitus on epididymal enzymes of adult rats. Indian Journal of Experimental Biology, 29: 907-9.

7- Chen, C. S., H. T. Chao, R. L. Pan and Y. H. Wei. 1997. Hydroxyl radical induced decline in motility and increase in lipid peroxidation and DNA modification in human sperm. Biochemistry & Molecular Biology International, 43: 291–303.

8- Dorman, H. J. D., O. Bachmayer, M. Kosar and R. Hiltunen. 2004. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52 (4): 762-770.

9- Duvoix, A., R. Blasius and S. Delhalle. 2005. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. Cancer Letters, 223: 181-90.

10- Ganong, W. F. 2001. Review of medical physiology. 20th edition. Philadelphia: McGraw- Hill, 383-0438.

11- Guneli, E., K. Tugyan, H. Ozturk, M. Gumustekin, S. Cilaker and N. Uysal. 2008. Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. European Surgical Research, 40: 354-60.

12- Heidari, Z., H. R. Mahmoud Zadeh Sagheb, H. Rafigh Doost and A. A. Moein. 2003. Analysis of gross anatomical parameters of kidney in male rats following Lead poisoning by using a stereological method. Journal of Zahedan University of Medical Sciences (Tabib-e-shargh), 5(2):134-123.

13- Ibrahim, M., El-A. Khalid, M. Ashry, F. Abeer, O. El-Nahasand and M. Salama. 2006. Protection by Turmeric and Myrrh against Liver Oxidative Damage and Genotoxicity Induced by Lead Acetate in Mice. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 98: 32-37.

14- Jafari Anarkooli, I., M. Sankian, A. R. Varasteh and H. Haghir. 2010. Effects of insulin and ascorbic acid on inhibition of the apoptosis in hippocampus of STZ-induced diabetic rats. Journal of Iranian Anatomical Sciences, 28(7): 133-143.

15- Kaushal, D., M. R. Bansal and M. P. Bansal. 1996. Cell kinetics of the rat seminiferous epithelium following lead acetate treatment. The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine, 9: 47-56.

16- Kermanian, F., M. Mehdizadeh, A. R. Mahmoudian, N. Markazi Moghadam and M. Kermanian. 2008. Evaluation of Lead Acetate Side Effects on Rat Hippocampus and the Effects of Vitamin C on These. Journal of Iranian

Anatomical Sciences, 6(23): 345-351.
17- Masuda, T., Y. Toi, H. Bando, T. Maekawa, Y. Takeda and H. Yamaguchi. 2002. Structural identification of new curcumin dimers and their contribution to the antioxidant mechanism of curcumin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 2524-25.
18- Modaresi, M., M. Messripour and R. Rajaei. 2010. Effect of cinnamon extract on the number of spermatocyte and spermatozoa cells in mice. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 26(1): 83-90. (In Persian).
19- Owu, D. U., A. B. Antai, K. H. Udofia, A. O. Obembe, K. O. Obasi and M. U. Eteng. 2006. Vitamin C improves basal metabolic rate and lipid profile in alloxan-induced diabetes mellitus in rats. Journal of Biosciences, 31(5): 575-579.
20- Pal, S., T. Choudhuri, S. Chattopadhyay, A. Bhattacharya, G. K. Datta, T. Das and G. Sa. 2001. Mechanisms of curcumin-induced apoptosis of Ehrlich's ascites carcinoma cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 288(2): 658-65.
21- Ping-Chi, H., L. Ming-Yie, H. Chao-Chin, C. Lih-Yuh and L. G. Yueliang. 1998. Effects of vitamin E and:or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. Toxicology, 128: 169-179.
22- Poma, A., E. Pittaluga, and A. Tucci. 2003. Lead acetate genotoxicity on human melanoma cells in vitro. Melanoma Research, 13: 563-566.
23- Saravanan, R. and L. Pari. 2005. Antihyperlipidemic and antiperoxidative effect of Diasulin, a polyherbal formulation in alloxan induced hyperglycemic rats. BMC Complementary and Alternative Medicine, 5: 14-21.
24- Saxena, S. K., R. S. Srivastava, B. Lal, and S. V. Chandra. 1987. The effect of lead exposure on testis of growing rats. Experimental Pathology, 31: 249-52.
25- Soudamani, S., S. Yuvaraj, S. Rengrajan, R. Sivakumar, T. Malini and K. Balasubramanian. 2006. Effects of streptozotocindiabetes and insulin replacement on androgen and estrogen receptor concentrations in the epididymis of Wistar rats. Journal of Endocrinology and Reproduction, 10: 59-61.
26- Srinivasan, M. 1972. Effect of curcumin on blood sugar as seen in a diabetic subject, Indian Journal of Medical Sciences, 26: 269-270.
27- Tatar, M., D. Qujeq, F. Feizi, H. Parsian, A. S. Faraji, S. Halalkhor, R. Abassi, Z. Abedian, R. Pourbagher, S. M. Aghajanpour, H. Mir and N. Seyfizadeh. 2010. Effects of Teucrium Polium Aerial Parts extract on oral glucose tolerance tests and pancreas histopathology in Streptozocin-induced rats. International Journal of Molecular and Cellular Medicine, 1(1): 44-49.
28- Vignon, F., A. Le Faou, D. Montagnon, A. Pradignac, C. Cranz and P. Winiszewsky. 1991. Comparative study of semen in diabetic and healthy men. Diabetes & Metabolism, 17: 350-401.
29- Wallace Hayes, A. 2001. Principles and methods of toxicology.4th ed. Philadelphia: Taylor and Francis, 667-9.
30- Yadav, S., V. Vats and Y. Dhunnoo. 2002. Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of Murraya koenigii leaves in diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology, 82: 111-6.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 8, No. 3, Fall 2016, p. 520-529

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 8، شماره 3، پاییز 1395، ص. 529-520

The protective effect of turmeric (*Curcuma longa*) to damage caused by lead acetate on feed intake, body weight change and reproductive performance of male Wistar rats

A. Ayoubi[1*]- R. valizade[2]- A. omidi[3]- A. babayi[4]

Received: 16-11-2013
Accepted: 10-10-2015

Introduction Hyperglycemia increase oxidative stress which contributes to development and progression of diabetic complications. Oxidative stress refers to an imbalance between the free radicals production and antioxidant defenses that led to tissue damage. Lead is known to induce a broad range of physiological, biochemical, and behavioral dysfunctions on nervous systems, haemopoietic system, cardiovascular system, kidneys, liver and reproductive systems in animals as well as humans. Furthermore, Lead absorbed through the digestive tract, respiratory system, and skin of animals. Lead can apply its toxic effects on various parts of the body. Some feed additives can protect animal body against adverse effects of the absorbed lead. This study investigated the protective effects of turmeric on adverse consequences of lead acetate in diabetic Wistar rat.

Materials and method Thirty-two male Wistar rats were randomly allocated to 4 groups of 8. The experimental groups were 1) the Control, 2) diabetic control (streptozotocin injected in dose of 55 ppm), 3) diabetic rats received lead acetate (55 ppm streptozotocin injected, 100 ppm of Lead acetate dissolved in water) and 4) diabetic rats received lead acetate and turmeric powder (55 ppm of streptozotocin injected, 100 ppm lead acetate dissolved in water, and 2% of feed turmeric powder). Streptozotocin (STZ) was dissolved in 0.1 M sodium citrate buffer at pH 4.5 just before use, and injected intraperitoneally (IP). Three days after STZ administration, the diabetic rats with blood glucose concentration more than 300 mg/dl were selected and divided into 4 groups. The experimental period was 4 weeks. At the end of the experiment (day 29) the rats were anesthetized with Ketamine (50 mg/kg) after withholding food for 12 h. The blood samples were taken from the heart apex to assess lipids, enzymes and hormone concentrations. The right testis was removed after collecting the blood, washed in saline, and fixed in 10% formalin at room temperature for 72 h. After fixing the tissue, it was thoroughly washed under running water and dehydrated in ascending grades of ethyl alcohol, cleared, and embedded in soft paraffin. Tissue sections of about 5µm were obtained, stained with hematoxylin and eosin, and examined under light microscope. Twenty seminiferous tubular sections were selected from stained testes of rats and then some parameters such as seminiferous tubule diameter, lumen, cell thickness and number of Leydig cells and Sertoli cells were measured and recorded.

Results and Discussion Feed intake and live weight gain significantly reduced in diabetic rats, in comparison with the control group. Lead acetate led to more reduction in feed intake although, turmeric feeding showed a positive response in this parameter (feed intake). Moreover, higher basal metabolic rate in diabetic rats led to increase in lipid and protein degradation. Based on histological findings, the activity of spermatogenous tissue was affected by diabetes treatment. The cell thickness and cell number of spermatocytes and sertoli cells reduced significantly in diabetic and lead exposure rats compared to the control group. This reduction was exacerbated in diabetic rats exposed to lead acetate. The number of sertoli cells and spermatocytes in diabetic and lead acetate rats showed a reduction trend. Decreasing seminiferous cell wall thickness is probably due to the effects of lead oxidation through increasing free radical production in the testes. Shrunken and narrow thickened basement membrane, sharp decrease in seminiferous cell wall thickness, increased the diameter of the lumen, interstitial tissue destruction and reducing the number of layers of spermatogenesis were seen in diabetic-lead acetate. These changes may affect sperm production and reproductive performance. Shrunken but organized seminiferous was observed in diabetic and lead acetate with turmeric rats than diabetic and lead treatment. Testosterone level reduced in lead acetate and diabetic rats in comparison with the control animals, but turmeric feeding led to an increment in testosterone concentration. Antioxidant activity effects of turmeric and binding with lead acetate decrease free radicals and reduce damage to the testes.

Conclusion Lead acetate probably increases oxidation in the testis tissue of diabetic rats with damages in the

1- PhD student of Animal Physiology, College of Agriculture, Tehran University,
2- Professor of Animal Sciences, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad,
3- Associate Professor of Animal Health Management, College of Veterinary Medicine, University of Shiraz,
4- Master graduate of Animal Physiology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.
(*Corresponding Author Email: ayyoubi.ar@gmail.com)

cell layers and reduced testosterone production and exacerbates the effects of diabetes on reducing reproductive performance. It was concluded that turmeric supplementation protect rats from some harmful effects of lead toxicity in form of lead acetate or other lead containing chemicals. The presence of special ingredients such as curcumin in turmeric powder with its antioxidative stress property was the main reason for this protective effects although more study are needed.

Key words: Diabetes, Lead, Turmeric, Testosterone, Testicular tissue, Wistar rat.