

اثر سرکه سیب بر اسپرمتوزن و ظرفیت تام آنتی اکسیدانی سرم موش‌های صحرایی تحت رژیم پر چرب

کامران رودخانه ایی^۱، منیره آفاجانی نسب^۲، معصومه عباسی^۱، فهیمه محمد قاسمی^{۳*}

^۱ کارشناسی ارشد علوم تشریحی، مرکز تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

^۲ استاد یار گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

^۳ دانشیار علوم تشریحی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

نویسنده مسئول: فهیمه محمد قاسمی، دانشیار علوم تشریحی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران. ایمیل: parsahistolab@gmail.com

DOI: 10.21859/hums-23037

چکیده

مقدمه: چاقی و رژیم پرچرب دارای اثرات سوء بر باروری مردانه است. هدف از مطالعه حاضر تعیین اثر سرکه سیب بر اسپرمتوزن و ظرفیت تام آنتی اکسیدانی سرم موش‌های صحرایی تحت رژیم پر چرب است.

روش کار: در این مطالعه تجربی تعداد ۲۴ سر موش صحرایی نر ویستار به ۳ گروه ۸ تایی: کنترل، رژیم پرچرب و رژیم پرچرب + سرکه سیب تقسیم شدند. گروه کنترل روزانه میزان ۱۶/۶% کیلوکالری و دو گروه دیگر غذای چرب محتوی روغن کانولا دارای ۵۱/۶% کیلوکالری مصرف می‌کردند. پس از ۱۶ هفته، گروه ۳ علاوه بر غذای دریافتی به مدت ۶ هفته روزانه سرکه سیب ۵% بصورت خوراکی در آب دریافت می‌کرد. در پایان دوره، پارامترهای اسپرم اپی دیدیم شامل: تعداد، مورفولوژی و حرکت محاسبه شد. سطح سرمی ظرفیت تام آنتی اکسیدانی (TAS)، تستوسترون و استرادیول با روش الایزا، آپوتوز بیضه با روش تانل و همچنین ارزیابی اسپرمتوزن با روش هیستولوژیک کمی انجام گرفت. جهت ارزیابی چاقی ایندکس لی محاسبه شد. آنالیز آماری با روش واریانس یکطرفه و تست توکی انجام گردید.

یافته‌ها: سرکه سیب باعث افزایش تعداد و حرکت سریع رو به جلو اسپرم‌ها در مقایسه با رژیم پرچرب شد ($P < 0/05$)، هر چند که بر مورفولوژی بی تأثیر بود. تعداد سلول‌های آپوتوتیک در گروه تحت درمان با سرکه کاهش یافت ($P < 0/001$). سرکه باعث افزایش سطح سرمی تستوسترون و TAS در مقایسه با گروه پرچرب شد ($P < 0/05$) ولیکن سطح استرادیول تغییری نیافت. سرکه ایندکس لی را در مقایسه با گروه پرچرب کاهش داد ($P < 0/001$) تعداد سلول‌های زایای اسپرمتوگونی، اسپرمتوسیت اولیه پاک‌تن، لپتوتن، اسپرمتاید گرد بین گروه‌ها تغییری نداشت. هر چند که تعداد اسپرم‌های دراز در گروه سرکه در مقایسه با گروه پرچرب افزایش داشت ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که استفاده روزانه سرکه سیب در رت‌های تحت رژیم پرچرب به مدت ۶ هفته، باعث بهبود اسپرمتوزن از طریق کاهش آپوتوز بیضه، افزایش TAS سرم و تستوسترون سرم می‌شود.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۲/۳

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۶/۸

واژگان کلیدی:

رژیم پرچرب

چاقی

سرکه سیب

آنتی اکسیدان

اسپرمتوزن

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

مقدمه

مشکل ناباروری در سراسر جهان جوامع مختلف را درگیر می‌نماید و پیامدهای اجتماعی آن گریبان‌گیر مردان و زنان نابارور است. بنا به گزارش سازمان بهداشت جهانی بهداشت، ناباروری حدود ۸۰ میلیون زوج را در سراسر دنیا تحت تأثیر قرار داده و میزان آن از ۳ تا ۵ درصد متفاوت است. ۵۰ درصد نازایی‌ها ناشی از فاکتور مردانه هستند. عواملی چون شرایط زندگی، فاکتورهای محیطی، سایکولوژیک، بیماری‌ها و عوامل دارویی می‌توانند بر باروری مردان مؤثر واقع شوند [۱] تغییر در شیوه زندگی و عادات غذا خوردن و چاقی نیز از جمله

مواردی است که می‌تواند مردان را در معرض ناباروری قرار دهد [۲].

شیوع چاقی در جوامع مدرن تحت تأثیر عوامل محیطی و رفتاری می‌باشد. درصد چربی در رژیم غذایی و فقدان فعالیت‌های ورزشی دو عامل محیطی مهم مؤثر بر چاقی هستند [۳]. افزایش وزن و چاقی، دو عامل خطر اصلی برای بیماری‌هایی از قبیل دیابت نوع دو، بیماری‌های عروق کرونر، اختلالات کارکردی و یا بیماری‌های کبد مانند کبد چرب غیر وابسته به الکل می‌باشند [۴]. مطالعات انسانی نشان داده‌اند که رژیم‌های پر چرب (رژیمی که بیش از ۳۰ درصد

زنانه نقش مهمی در اسپرماتوژنز ایفا می‌کند [۱۱، ۱۲]. بطور کلی هورمون‌های جنسی و پارامترهای اسپرم نقش محوری و اصلی در باروری و تولید مثل مردان دارند. دیده شده است که مردان چاق در مقایسه با مردان غیر چاق بیشتر به اولیگو اسپرمی مبتلا هستند [۱۳] ضمن این که افزایش ایندکس توده بدنی در مردان با کاهش سطوح اینهیبین b و تستوسترون و کاهش حجم منی حین انزال همراه است. چاقی باعث کاهش حرکت پیشرونده و همچنین افزایش تعداد اسپرم‌های بی حرکت و کاهش حجم منی و تعداد اسپرم می‌شود [۱۴]. در مردان چاق فعالیت میتوکندری اسپرم کمتر است و اختلال DNA اسپرم بالاتر است [۱۵]. هر چند که بر خلاف موارد ذکر شده در بالا مطالعات مختلفی نیز نشان داده‌اند که تعداد، حرکت و مورفولوژی اسپرم‌ها با افزایش ایندکس توده بدنی تغییر نمی‌کند [۱۵، ۱۶]. از دوره‌های بسیار دور نشان داده شده که تغییر در سبک مصرف مواد غذایی در کنترل وزن و چاقی مؤثر است. یکی از مواردی که از دیر باز بشر آن را می‌شناخته و جهت کنترل وزن مورد استفاده قرار می‌داده است سرکه می‌باشد.

سرکه محلولی است رنگی که عمدتاً حاوی آب و اسید استیک است. این ماده از هر نوع محصول غذایی و یا میوه که حاوی قند طبیعی باشند بدست می‌آید. مخمرها این قندها را به الکل تخمیر می‌کنند و انواع خاصی از باکتری‌ها بنام استو باکتر الکل را به اسید استیک تبدیل می‌کنند. طعم تند و زننده سرکه ناشی از اسید استیک آن است [۱۷، ۱۸]. انواع مختلفی از سرکه‌ها چه بصورت سنتی و چه صنعتی وجود دارند که بسته به نواحی جغرافیایی متنوع در جهان مصارف متنوعی نیز دارند. در حیوانات آزمایشگاهی نشان داده شده که سرکه سیب باعث کاهش وزن، کاهش آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز کبد، کاهش تری گلیسیرید LDL و افزایش HDL و کاهش هموگلوبولین HbA_{1c} می‌شود [۱۹، ۲۰]. علاوه بر آن در انسانها نیز مصرف سرکه می‌تواند باعث کاهش وزن و تغییر پروفایل لیپیدی پلاسما شود [۲۱]. مصرف سرکه بالزامیک نیز در حیوانات دیابتی از طریق بهبود کارکرد سلول بتای پانکراس دارای خاصیت آنتی دیابت است [۲۲]. تجویز سرکه سفید در رت‌های دیابتیک باعث کاهش وزن و بهبود هیپر گلیسمی می‌شود [۲۳]. ضمن این که مصرف سرکه گوجه فرنگی در موش‌های تحت رژیم پرچرب نیز باعث کاهش وزن، کاهش اسید چرب آزاد پلاسما، کاهش تری گلیسیرید پلاسما و کبد می‌شود [۲۴].

علاوه بر موارد فوق سرکه بر روی مسیر آپوپتوز سلول‌های توموری نیز نقش دارد. مطالعات *in vitro* نشان داده‌اند که

انرژی آن ناشی از چربی باشد) می‌توانند به آسانی باعث القاء چاقی شوند [۵]. رژیم‌های پر چرب نه تنها در انسان بلکه در حیوانات نیز می‌توانند باعث القاء چاقی شوند [۶]. مطالعات نشان می‌دهند که رژیم پر چرب باعث افزایش تری گلیسیرید، کاهش تستوسترون سرم، کاهش کیفیت و بلوغ اسپرماتوژنز و افزایش نیتریک اکساید سرم می‌شود تعداد و حرکت اسپرم و تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک در رت‌های نر مدل کبد چرب غیر الکلی که با رژیم پرچرب تغذیه می‌شوند در مقایسه با رت‌های کنترل کمتر می‌باشد [۷]. چاقی ناشی از رژیم پرچرب می‌تواند با افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و در نتیجه تولید رادیکال‌های آزاد همراه باشد [۸]. رادیکال‌های آزاد در شرایط عادی در بدن تولید می‌شوند. آن‌ها می‌توانند بر روی سیستم ایمنی یا لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA اثر کرده و آن‌ها را اکسیده نمایند. به منظور کاهش و یا دفاع در برابر این سیستم بدن مجهز به یک سیستم آنتی اکسیدانی می‌باشد. هر گونه عدم تعادل در این مجموعه آنتی اکسیدانی و سیستم اکسیدانی باعث ایجاد استرس سلولی می‌شود که می‌تواند مسیر سلول را به سمت پاتولوژی، پیری، سرطان، آپوپتوز و یا مرگ پیش ببرد [۹]. آپوپتوز نوعی مرگ برنامه ریزی شده فیزیولوژیک سلولی است که در بافت‌های مختلف بدن هم در دوره جنینی و هم بزرگسالی رخ می‌دهد. آپوپتوز تحت برخی شرایط در سلول‌ها القاء می‌شود مانند: داروها و عوامل شیمی درمانی، بیماری‌ها، تغییرات ژنی و تغییرات هورمونی [۱۰]. آپوپتوز طی چند مرحله در سلول رخ می‌دهد و منجر به بروز تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیک سلولی و در نهایت مرگ سلول می‌شود [۱۰]. آزمایشات تجربی نشان داده‌اند که رژیم پرچرب به تنهایی می‌تواند باعث بروز سیگنال‌های مرگ سلولی در سلول‌های زایای بیضه شود [۷]. ضمن این که دیده شده رژیم پرچرب باعث کاهش وزن بیضه و هورمون تستوسترون می‌شود [۷].

اسپرماتوژنز یک فرایند پیچیده ایست که تحت تأثیر عوامل مختلف هورمونی، فیزیکی، شیمیایی و فاکتورهای محیطی قرار می‌گیرد. هورمون‌های جنسی به خصوص تستوسترون، FSH و LH اثرات مهمی بر این روند دارند. لازم به ذکر است که هورمون زنانه استروژن نیز نقش مهمی در شروع، حفظ و بلوغ این روند دارد. انواع مختلف سلول‌های زایای موجود در بیضه به خصوص سلول‌های هاپلوئید یعنی اسپرماتید های گرد و دراز، سلول‌های لیدیگ و سرتولی دارای رسپتور استروژن هستند. ضمن این که دارای آنزیم آروماتاز هستند که می‌تواند بصورت غیر قابل برگشت آندروژن را به استرادیول تبدیل کند به عبارت دیگر استروژن به عنوان یک هورمون

روش کار

حیوانات مورد آزمایش

در مطالعه تجربی حاضر، تعداد ۲۴ رأس موش صحرایی نر نژاد ویستار بالغ ۱۲ الی ۱۴ هفته‌ای با وزن ۲۰۰ الی ۲۲۰ گرم، در قفس‌های مخصوص حیوانات نگهداری شدند. حیوانات در دمای محیط ۲۳/۲ درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعت با دسترسی آزادانه به آب و غذا قرار داشتند. جهت سازگاری با محیط، حیوانات به مدت یک هفته در آزمایشگاه نگهداری شدند. در ابتدا حیوانات پس از توزین اولیه به صورت راندام به سه گروه شامل گروه کنترل (۸ نمونه)، گروه رژیم پرچرب (۸ نمونه) و گروه رژیم پرچرب و سرکه سیب (۸ نمونه) تقسیم شدند.

رژیم غذایی

گروه کنترل غذای معمول را دریافت کردند که حاوی ۱۶/۶ درصد کیلو کالری بود. حیوانات تحت رژیم پرچرب به مدت ۴ ماه در شرایط بی‌حرکی و مصرف غذای چرب حاوی ۳۵ درصد کیلو کالری، در مجموع ۵۱/۶ درصد کیلو کالری قرار گرفتند.

جهت ایجاد غذای چرب از روغن کانولا استفاده شد که سازمان غذا و دارو آمریکا آن را بدلیل داشتن اروسیک اسید و گلوکوزینولات کم در سال ۱۹۸۵ میلادی به عنوان GRAS یا غذای مطمئن *generally recognized as safe* در رژیم غذایی معرفی کرده است [۲۱]. نظر به مطالعه Saliva و همکاران در سال ۲۰۰۶، میزان ۷ گرم روغن کانولا و یا ۷ گرم روغن سویا و یا ۷ گرم روغن نخل به ازاء هر ۱۰۰ گرم رژیم غذایی در رت‌های ویستار نر جوان منجر به ایجاد ۱۶ درصد کیلوکالری می‌شود. به عبارت دیگر تقریباً هر یک گرم روغن کانولا معادل ۲/۲۸ درصد کیلوکالری در رت‌ها ایجاد انرژی می‌کند [۲۲]. در مطالعه حاضر به منظور ایجاد ۳۵ درصد کیلوکالری در رژیم غذایی، به ازاء هر ۱۰۰ گرم غذای حیوان، ۱۵/۳۵ گرم روغن کانولا اضافه گردید. غذا بصورت هفتگی تهیه و تا اتمام مصرف در یخچال نگهداری شد. در کل دوره درمان وزن گیری حیوانات به صورت هفتگی انجام گرفت و نتایج ثبت شد.

پس از گذشت ۴ ماه، حیوانات تحت رژیم پرچرب در ۲ گروه ۸ تایی (تحت رژیم پرچرب، تحت رژیم پرچرب و سرکه سیب) قرار گرفتند. در نهایت حیوانات مورد مطالعه شامل ۳ گروه ۸ تایی به صورت زیر بودند:

۱- گروه کنترل ۲- گروه تحت رژیم پرچرب ۳- گروه تحت رژیم پرچرب و سرکه سیب

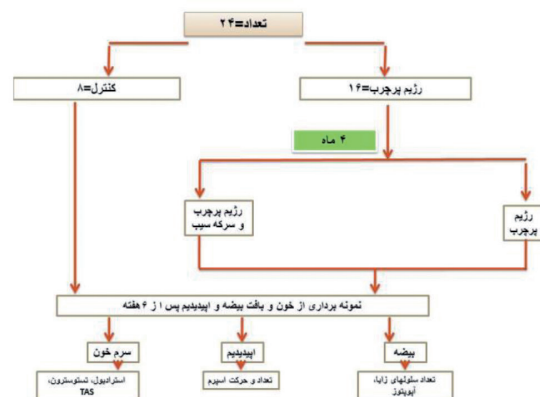
سرکه نیشکر باعث آپوپتوز سلول‌های لوکمی انسانی می‌شود [۲۵]. سرکه برنج ژاپنی نیز بصورت وابسته به دوز باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود [۲۶]. موش‌های تغذیه شده با سرکه سوچوآ که با سلول‌های توموری سارکوما انکوبه شده بودند در مقایسه با گروه کنترل خود، سائیز تومورشان کاهش یافت [۲۷]. سرکه‌ها همچنین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز هستند. چرا که دارای منبع غنی از پلی‌فنل هستند که خود عامل دفاعی مهمی برای استرس اکسیداتیو به شمار می‌آید. دریافت پلی‌فنل در انسان باعث افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدان و کاهش ریسک ابتلا به کانسر می‌شود [۲۸]. در این رابطه نشان داده شده است که سرکه کوروسو (ژاپنی) در موش‌های تحت درمان با H_2O_2 باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود [۲۹]. سرکه‌ها بر اساس این که از چه ماده اولیه ایی تهیه شوند قدرت اثرات متفاوتی نیز دارند. با توجه به این که چاقی به عنوان یکی از معضلات فعلی دنیای امروز می‌باشد و عوارض ناشی از آن من جمله ناباروری از نظر اجتماعی و اقتصادی بسیار بالاست و برخی اوقات ضربات جبران ناپذیری بر سلامت فرد، خانواده و جامعه می‌گذارد. لذا اعمال هر گونه تغییری در روش زندگی که بتواند عوارض ناشی از چاقی را کاهش دهد بسیار مهم و با ارزش می‌باشد. از طرفی دیگر عمده مطالعاتی که در مورد اثر سرکه‌ها بر روی کنترل چاقی صورت گرفته است مطالعات سرولوژیک در حیطة پروفایل لیپیدی، آنزیم‌های کبدی، سطوح سرمی گلوکز و یا انسولین بوده‌اند [۱۹، ۲۴]. ضمن این که بر اساس مطالعه ما تا کنون مطالعه‌ای بر روی اثر سرکه بر اسپرماتوژنز و یا دستگاه تولید مثل مردانه صورت نگرفته است. از طرفی دیگر نشان داده شده که چاقی می‌تواند باعث افزایش بروز ناباروری در مردان شود ضمن این که، مصرف سرکه می‌تواند به نوعی کنترل کننده چاقی باشد فرض ما بران است که شاید سرکه بتواند با کنترل چاقی و در نتیجه تأثیر بر تغییر بافت بیضه و همچنین کارکرد بیضه و تغییرات هورمون‌های جنسی چون تستوسترون و استرادیول مانع تغییرات سوء ناشی از چاقی در اسپرماتوژنز رت‌های تحت رژیم غذای پرچرب شود. نظر به این که سرکه‌ها فراوان، در دسترس و هم نسبتاً ارزانند و از طرفی دیگر به عنوان استفاده دارویی جذاب نیز می‌باشند، لذا بر آن شدیم تا اثر سرکه سیب را بر روی اسپرماتوژنز، و سطح سرمی هورمون‌های تستوسترون، استرادیول و همچنین سطح تام آنتی‌اکسیدانی سرم موش صحرایی تحت رژیم چاقی بررسی و در نهایت با یکدیگر مقایسه نمائیم.

برنامه درمانی با سرکه

در گروه سوم، حیوانات تحت درمان با سرکه سیب با غلظت ۵ درصد، به مدت ۶ هفته قرار گرفتند. سرکه به بصورت خوراکی و همراه با آب مورد مصرف قرار می‌گرفت [۱۸].

تشریح حیوانات و نمونه برداری

در پایان دوره آزمایش، توزین حیوانات انجام گردید. حیوانات با کتامین (۵۰ mg/kg) و زایلازین (۲/۲ mg/kg) به صورت تزریق داخل صفاقی بیهوش شدند. قد نازوآنال ثبت شده و شکم حیوانات باز شد. سپس اقدام به خونگیری به میزان ۵ سی سی، از ورید اجوف تحتانی یا مستقیماً از قلب، گردید. سرم خون با کمک سانتریفوژ با دور ۴۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جدا شده و تا زمان آزمایش در ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شد. بیضه حیوانات از حفره شکم خارج و نمونه برداری شد. به منظور بررسی‌های بافت شناسی به مدت ۴۸ ساعت در محلول بوین و پس از آن به مدت ۲ روز نیز در فرمالین ۱۰ درصد در دمای اتاق نگهداری گردید (تصویر ۱).



تصویر ۱: پروتکل تحقیق

ارزیابی چاقی با روش اندازه گیری ایندکس لی

به منظور ارزیابی چاقی در رت‌ها از ایندکس لی استفاده می‌شود که معادل شاخص حجم بدن یا BMI در انسان می‌باشد. فرمول محاسبه آن عبارتست از: ریشه سوم وزن به گرم تقسیم برقد نازوآنال به سانتی متر ضرب در ۱۰۰۰ است که میزان بیشتر از ۳۱۰ نشان دهنده چاقی می‌باشد [۹].

$$\text{Lee index} = (\sqrt[3]{\text{weight} \div \text{length}}) \times 1000$$

بررسی‌های بیوشیمیایی

بعد از انجام خونگیری و جدا کردن سرم در هر یک از مراحل کلیه نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی در ۲۰- درجه نگهداری می‌شدند. تعیین سطح تستوسترون

آزاد و استرادیول سرم با استفاده از روش الیزا و بر اساس دستورالعمل کیت‌های Monobind امریکا صورت گرفت. جهت تعیین سطح کلی آنتی اکسیدان سرم از روش الیزا و بر اساس دستورالعمل کیت TAS کمپانی Zellbio آلمان استفاده شد. جذب نور در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. با استفاده از مقادیر به دست آمده و غلظت‌های مشخص محلول استاندارد نمودار خطی در نرم افزار Excel رسم و غلظت نمونه‌ها مشخص گردید. حساسیت کیت ۰/۱ میلی مولار بود.

ارزیابی تعداد و حرکت اسپرم

جهت ارزیابی تعداد و حرکت اسپرم از دم اپیدیدیم استفاده شد. اپیدیدیم به داخل پتری دیش حاوی محلول DMEM تهیه شده از شرکت Sigma، که قبل از استفاده در ۳۷ درجه سانتی گراد گرم شده بود انتقال داده شد، به منظور خارج شدن اسپرم‌ها از دم اپیدیدیم، اپیدیدیم توسط تیغ جراحی به قطعات کوچک بریده شده و سپس پتری دیش در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵% CO₂ به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده می‌شد. پس از گذشت این زمان پتری دیش از انکوباتور خارج شده و جهت ارزیابی حرکت اسپرم، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول بر روی یک لام نئوبار چکانده و روی آن یک لامل قرار داده می‌شد. در هر حیوان حداقل ۵ فیلد میکروسکوپی (فیلد مرکزی و چهار گوشه مکعب) با بزرگ نمایی x۴۰۰ مورد مطالعه قرار گرفته و درصد اسپرم‌های متحرک مشخص شد. حرکت اسپرم‌ها به چهار نوع تقسیم و بیان می‌شد

- ۱- بی حرکت ۲- حرکت درجا ۳- حرکت آهسته رو به جلو
- ۴- حرکت پیشرونده به جلو

جهت ارزیابی تعداد اسپرم‌ها ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم بر روی یک لام نئوبار انتقال داده می‌شد و تعداد اسپرم‌ها در ۵ خانه (فیلد مرکزی و چهار گوشه مکعب) از لام نئوبار شمارش می‌گردید و بصورت تعداد در میلی لیتری بیان می‌شد. همچنین جهت ارزیابی مورفولوژیک اسپرم، یک قطره ۲۰ میکرولیتری نیز از سوسپانسیون اسپرم بر روی یک اسلاید گسترانده شده و پس از خشک شدن در هوای اتاق در اتانول ۹۶٪ فیکس و با روش H&E رنگ آمیزی شده، پس از چسباندن لامل و خشک شدن، اسلاید در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی x۱۰۰۰ از نظر مورفولوژی سر و دم مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. اشکال غیر نرمال مانند کوچکی یا بزرگی سر، دو سر بودن، جدایی سر از دم، دم کوتاه یا بلند، دم مارپیچی یا خمیده و وجود دو دم بعنوان موارد غیر نرمال در نظر گرفته شده و به درصد بیان می‌شد

مطالعه اسپرماتوزن و ارزیابی لوله‌های سمینفروس

پس از اطمینان از ثبوت بافتی، پاساژ بافت با الکل با

درجات صعودی، گزیرول، و سپس قالبگیری با پارافین صورت

گرفت. با استفاده از میکروتوم دوار اقدام به تهیه برشهای ۵ میکرونی شد. به منظور ارزیابی تغییرات کیفی هیستولوژیکی از رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین و میکروسکوپ نوری المپوس ژاپن با درشت نمایی ۴۰۰ برابر استفاده گردید. به منظور ارزیابی اسپرمتوژنز در هر حیوان مقطع بیست لوله سمینیفروس در مقطع عرضی در مراحل VII و VIII اسپرمتوژنز انتخاب و با استفاده از لنز چشمی مدرج میکروسکوپ نوری المپوس مقاطع ۱ در ۱ میلی متر انتخاب و اقدام به شمارش سلولهای اسپرمتوگونی، اسپرمتوسیت اولیه لپتوتن و پاکی تن، اسپرمتیدهای جوان گرد و اسپرمتیدهای دراز شد.

مطالعه آپوپتوز

مطالعه آپوپتوز در بافت بیضه با روش ایمونوهیستوشیمیایی تانل صورت گرفت. این روش فراگماتناسیون هسته آپوپتوتیک را مشخص می‌نماید. نحوه کار: بدین منظور از روش TUNEL و با کمک کیت تشخیصی (Roche) استفاده شد. کلیه مواد و محلول‌ها از کمپانی (Roche) تهیه شد. ابتدا برش‌های با ضخامت ۵ میکرون تهیه و پس از آن مرحله پارافین‌زدایی با کمک گزیرول در دو مرحله انجام و بافت دراتانول با درجات نزولی قرار گرفت. پس از انکوبه بافت با پراکسیداز، با کمپروتیناز k، پروتئین‌های اضافی هسته برداشته شد. سپس نمونه با محلول تانل برای مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور، انکوبه می‌شد. پس از شستشو و خشک نمودن، اسلایدها با میکروسکوپ ایمونوفلورسنت و بزرگنمایی ۲۰۰ برابر ارزیابی می‌شدند سلول‌های آپوپتوتیک به رنگ سبز مایل به زرد درخشان مشخص شدند، در هر حیوان ۶ الی ۱۰ مقطع انتخاب و اقدام به شمارش سلول‌های آپوپتوتیک سلول‌های زایای لوله سمینیفروس و همچنین سلول‌های لیدینگ گردید. روش‌های تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج پس از ارزیابی توزیع طبیعی داده‌ها توسط آزمون کلموگروف-اسمیرنوف با روش آنالیز واریانس یکطرفه و سپس تست توکی مورد ارزیابی قرار گرفت. در صورت $P > 0.05$

یافته ها

ارزیابی چاقی

نتایج نشان گر این بودند که در وزن اولیه حیوانات با یکدیگر تفاوتی نداشت. در طی ۲۲ هفته وزن کلیه حیوانات به تدریج افزایش می‌یافت در حالی که وزن نهایی حیوانات در گروه پرچرب نسبت به کنترل افزایش داشت. ایندکس لی در حیوانات پرچرب در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌دار افزایش داشت. و سرکه سیب بصورت معنی‌داری این میزان را در گروه پرچرب کاهش داد (جدول ۱) و (تصویر ۲).

ارزیابی اسپرمتوژنز

بر اساس مشاهداتی که با استفاده از میکروسکوپ نوری صورت گرفت در بیضه گروه کنترل در لوله‌ها اسپرمتوژنز فعال برقرار بود. در ضخامت اپی تلیوم ژرمینال تمام رده سلول‌ها شامل سلول‌های اسپرمتوگونی، اسپرمتوسیت اولیه و ثانویه، اسپرمتیدهای گرد، اسپرمتادهای دراز (اسپرمتوزوا) و همچنین سلول‌های سرتولی مشاهده شدند. محدوده اغلب لومن‌هایی که در فاز ۷ و ۸ اسپرمتوژنز بودند، دارای تعداد زیادی اسپرمتوزویید بود که بصورت منظم در حاشیه لومن قرار گرفته بودند. در بافت بینابینی بافت همبند سست حاوی عروق خونی و سلول‌های همبندی به انضمام سلول‌های لیدینگ مشاهده شد. سلول‌های لیدینگ بصورت گروهی و اسیدوفیل دیده می‌شدند (تصویر ۱). تعداد سلول‌های زایای اسپرمتوگونی A، اسپرمتوسیت اولیه لپتوتن، اسپرمتوسیت اولیه پاکی تن، اسپرمتیدهای گرد در گروه‌های مختلف تفاوتی نداشتند (جدول ۲) در حالی که تعداد اسپرم‌های دراز در گروه پرچرب در مقایسه با کنترل کاهش معنی‌دار داشتند $11/2 \pm 90/2$ در مقابل $10/8 \pm 68/8$. مصرف سرکه سیب توانست این کاهش را در مقایسه با گروه پرچرب بهبود بخشد $12/3 \pm 82/31$ در مقابل $10/8 \pm 68/8$ (جدول ۲).

جدول ۱: تأثیر سرکه سیب بر وزن و ایندکس لی رت بالغ تحت رژیم پرچرب a

گرم	وزن اولیه، گرم	وزن نهایی، گرم	ایندکس لی
کنترل	$237/12 \pm 10/56$	$372/25 \pm 26/22$	$304/34 \pm 4/9$
پرچرب	$224/38 \pm 5/01$	$464/38 \pm 21/08$	$33/58 \pm 4/99$ ^b
پرچرب + سرکه سیب	$241/12 \pm 10/34$	$448/62 \pm 31/42$	$324/96 \pm 9/8$ ^c

^a همه مقادیر بصورت انحراف معیار \pm میانگین می‌باشند.

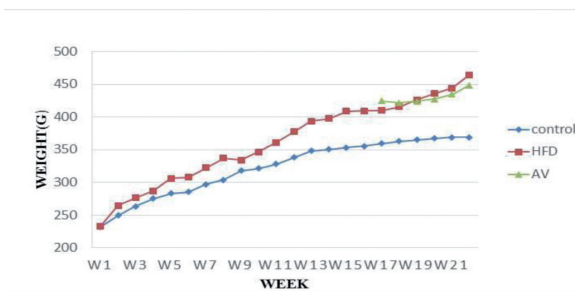
^b مقادیر معنی‌دار در مقایسه با کنترل $P \leq 0.05$.

^c مقادیر معنی‌دار در مقایسه با گروه پرچرب $P \leq 0.001$.

با کنترل کاهش داد $P < 0/01$ مصرف سرکه سیب میزان هورمون تستوسترون را در مقایسه با گروه پرچرب بالا برد ($P < 0/01$) (جدول ۳). نتایج ارزیابی هورمون استرادیول نشان داد که میزان استرادیول در گروه پرچرب در مقایسه با کنترل کاهش غیر معنی دار داشته است. بین گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی داری در میزان هورمون استرادیول یافت نشد. (جدول ۳).

ارزیابی ظرفیت تام آنتی اکسیدانی سرم (TAC)

میزان آنتی اکسیدان سرمی در گروه کنترل $0/30 \pm 0/74$ بدست آمد. در گروه پرچرب در مقایسه با کنترل این میزان کاهش معناداری نشان داد $0/16 \pm 0/11$ ($P < 0/001$). مصرف سرکه سیب باعث افزایش این پارامتر در سطح سرمی در مقایسه با گروه پرچرب شد $0/25 \pm 0/44$ (جدول ۳).



تصویر ۲: نمودار تغییرات وزن حیوانات در گروه‌های مختلف C، کنترل؛ HFD، رژیم پرچرب؛ AV، رژیم پرچرب+ سرکه سیب.

ارزیابی هورمون

نتیجه ارزیابی هورمونی نشان داد که میزان تستوسترون در گروه کنترل $1/7 \pm 4/16$ ng/mL بود. رژیم غذایی چرب طی ۲۲ هفته میزان تستوسترون را بصورت معنی دار در مقایسه

اسپرما توگونی A	لپتوتن	پاکی تن	اسپرما تید گرد	اسپرما تید دراز
۴/۶ ± ۰/۱	۴۹/۶۷ ± ۵/۹۲	۲۶/۸ ± ۴/۱	۷۸/۲ ± ۱۰/۱	۹۰/۲ ± ۱۱/۲
۴/۲ ± ۰/۲	۴۴/۸۳ ± ۳/۳۱	۲۲/۱ ± ۳/۲	۶۹/۸ ± ۸/۸	۶۸/۸ ± ۱۰/۸ ^b
۴/۵ ± ۰/۱	۴۸/۶۷ ± ۵/۹۸	۲۴/۲ ± ۴/۲	۷۴/۶ ± ۱۰/۳	۸۲/۳۱ ± ۱۰/۳ ^c

^a همه مقادیر بصورت انحراف معیار ± میانگین می‌باشند.

^b مقادیر معنی دار در مقایسه با کنترل $P < 0/01$

^c مقادیر معنی دار در مقایسه با گروه پرچرب $P < 0/05$ تعداد سلول‌ها در مساحت ۵۰۰ میکرومتر مربع محاسبه شده است.

تستوسترون، ng/mL	استرادیول، pg/mL	TAC سرم، mM
۴/۱۶ ± ۱/۷	۷۵/۵۱ ± ۷/۳۹	۷۴/۰ ± ۳۰/۰
۴۶/۱ ± ۶۱/۱	۶۸/۹ ± ۲۳/۵۷	۱۶/۰ ± ۱۱/۰ ^b
۶۹/۰ ± ۶۰/۲	۱۶/۱۸ ± ۸۱/۶۵	۲۵/۰ ± ۴۴/۰ ^c

^a همه مقادیر بصورت انحراف معیار ± میانگین می‌باشند.

^b مقادیر معنی دار در مقایسه با کنترل $P < 0/01$

^c مقادیر معنی دار در مقایسه با گروه پرچرب (TAC) $P < 0/05$ ، ظرفیت تام آنتی اکسیدانی.

تعداد ($\times 10^6$)	بی حرکت	حرکت درجا	حرکت رو به جلوی آهسته	حرکت رو به جلوی سریع	مورفولوژی نرمال
۱۵/۵۱ ± ۲/۷۱	۲۸/۰ ± ۶/۵	۲/۳۲ ± ۱۷/۳۸	۱۷/۳۸ ± ۲/۳۲	۲۲/۸۸ ± ۲/۰۳	۶۱/۵۰ ± ۵/۶۱
۱۱/۳۵ ± ۱/۹۱	۴۶/۲۱ ± ۲/۷۱ ^b	۲۰/۶۲ ± ۱/۸۴ ^b	۲۴/۲۵ ± ۴/۸۹	۱۱/۳۸ ± ۱/۱۸ ^b	۴۹/۳۳ ± ۶/۴۳ ^b
۱۴/۶۹ ± ۱/۲۹ ^c	۳۱/۵۱ ± ۲/۴۶ ^c	۱/۶۶ ± ۱۷/۷۵ ^c	۱/۸۴ ± ۱۹/۶۲ ^c	۲۰/۰۰ ± ۰/۷۵ ^c	۵۳/۵۰ ± ۹/۰۹ ^c

^a همه مقادیر بصورت انحراف معیار ± میانگین می‌باشند.

^b مقادیر معنی دار در مقایسه با کنترل $P < 0/01$

^c مقادیر معنی دار در مقایسه با گروه پرچرب $P < 0/001$

ارزیابی پارامترهای اسپرم

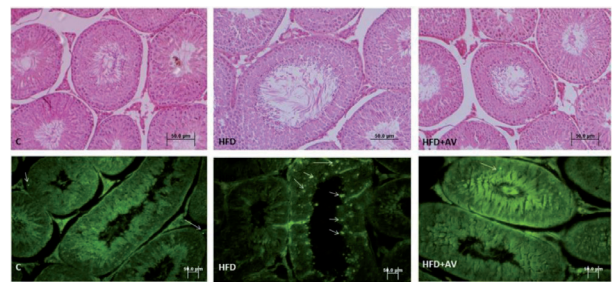
تعداد اسپرم در گروه کنترل $10^6 \times 71/2 \pm 51/15$ mL بود. مصرف غذای پرچرب طی ۲۲ هفته باعث کاهش معنی‌دار آن به میزان $10^6 \times 91/1 \pm 35/15$ mL شد ($P < 0/001$). مصرف سرکه سیب بصورت معنی‌دار باعث افزایش این میزان به $10^6 \times 14/69 \pm 1/29$ mL شد. درصد اسپرم‌های بی‌تحرك در گروه پرچرب ۴۶/۲۱ در صد بود که افزایش معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل، ۲۸ در صد نشان داد. مصرف غذای پرچرب همچنین باعث افزایش میزان درصد اسپرم‌های با حرکت درجا ۲۰/۶۲ در صد در مقایسه با کنترل شد ۱۷/۳۸ درصد ($P < 0/01$). از طرف دیگر در صد اسپرم‌های با حرکت سریع در گروه پرچرب ۱۱/۳۸ در مقایسه با کنترل ۲۲/۸۸ درصد کاهش معنی‌دار یافت ($P < 0/001$). مصرف سرکه سیب توانست بر حرکت اسپرم‌ها مؤثر واقع شود و باعث بهبود حرکت آن‌ها در مقایسه با گروه پرچرب شود (جدول ۴). همچنین غذای پرچرب باعث کاهش در صد مورفولوژی نرمال در اسپرم‌ها شد ۴۹/۳۳ در مقایسه با کنترل ۶۱/۵۰ در صد ($P < 0/001$). هر چند که سرکه سیب درصد اسپرم نرمال را در مقایسه با گروه پرچرب افزایش داد ولیکن این افزایش معنی‌دار نبود (جدول ۴).

۱۲/۶۷ در فیلد میکروسکوپی بود در حالیکه میزان این پارامتر در گروه پرچرب $6/91 \pm 33/17$ بود که افزایش معنی‌دار در مقایسه با کنترل داشت ($P < 0/001$) سرکه سیب توانست این میزان را به $22/83 \pm 6/49$ در فیلد میکروسکوپی کاهش دهد ($P < 0/05$) (تصویر ۳).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مصرف سرکه سیب با غلظت ۵ درصد بصورت خوراکی به همراه آب آشامیدنی، در طی ۶ هفته در رت‌های نر تحت رژیم غذایی پرچرب، دارای اثرات محافظتی بر روی بافت بیضه بوده و باعث بهبود برخی پارامترهای اسپرم و کاهش آپوتوز بافت بیضه و افزایش هورمون تستوسترون و افزایش TAC سرم می‌گردد. علیرغم این موضوع، تجویز سرکه سیب اثر معناداری بر سطح استرادیول نداشته است.

در مطالعه حاضر تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه پاک‌تن و لپتوتن، اسپرماتوسیت ثانویه، اسپرماتید گرد تغییر نداشتند در حالی که اسپرماتیدهای دراز یا اسپرماتوزواها تنها سلول‌هایی بودند که در گروه تحت رژیم پرچرب کاهش داشتند به عبارت دیگر رژیم پرچرب بر روی اسپرماتوسیتوژنز مؤثر نبود بلکه بر روی اسپرمیوژنز مؤثر بود. شاید بتوان این تغییرات را به کاهش هورمون تستوسترون ربط داد. فرایند اسپرماتوژنز و باروری مردانه وابسته به حضور تستوسترون می‌باشد و در غیاب تستوسترون یا رسپتورهای آندروژنی اسپرماتوژنز دچار اختلال می‌شود بخصوص در مراحل پس از میوز [۳۰]. تستوسترون توسط سلول‌های لیدیگ ترشح می‌شود میزان تستوسترون بیضه ۲۵ تا ۱۲۵ برابر سرم است (۲۰۰۰-۳۴۰ نانومتر در بیضه) در مقابل (۳۵-۷/۸ نانومتر در سرم). در جوندگان نیز مانند انسان همین ضرورت وجود دارد [۳۰]. مطالعات انجام شده روی جوندگان بیانگر آنند که محرومیت از تستوسترون در اختلال تکامل سلول‌های زایا بخصوص مراحل آزاد سازی اسپرم در مراحل ۷ و ۸ [۳۱]. در حیواناتی که سلول‌های سرتولی آنها فاقد رسپتور آندروژنی است در سه مرحله اختلال باروری خواهند داشت: ۱- اختلال در سد خونی بیضه ایی که باعث در معرض قرار گرفتن کلیه سلول‌های زایا با عوامل ایمنولوژیک می‌شود [۳۲]. ۲- بدلیل نقص در چسبندگی سلول‌های اسپرماتید گرد به سرتولی، باعث بلوکه شدن تبدیل اسپرماتید گرد به دراز می‌شود به عبارتی دیگر فرایند اسپرمیوژنز دچار اختلال می‌شود [۳۳]. اسپرماتوزواها نمی‌توانند آزاد شوند در نتیجه توسط سلول‌های سرتولی فاگوسیته می‌شوند [۳۴].



تصویر ۳: فوتومیکروگراف نوری از لوله‌های سمنیفروس رت بالغ. ردیف بالا رنگ امیزی هماتوکسیلین-ایوزین
ردیف پایین ایمونوهیستوشیمی، رنگ آمیزی تانل. پیکان‌های سفید نمایشگر هسته‌های با رنگ سبز درخشان و به عبارتی سلول‌های آپوتوتیک می‌باشند. بزرگنمایی ۲۰۰ برابر. C، کنترل؛ HFD، رژیم پرچرب؛ HFD+AV، رژیم پرچرب + سرکه سیب.

ارزیابی آپوتوز سلول‌های زایا و لیدیگ

در ارزیابی آپوتوز در سلول‌های لیدیگ هیچ تفاوت معنی‌داری آماری بین گروه‌های مختلف دیده نشد. تعداد سلول‌های لیدیگ آپوتوتیک در گروه‌های کنترل، پرچرب و سرکه سیب به ترتیب $1/03 \pm 2/67$ و $2/42 \pm 3/67$ و $0/54 \pm 2/50$ در فیلد میکروسکوپی بودند در همه گروه‌ها تعداد بسیار کمی از سلول‌های لیدیگ بصورت آپوتوتیک به چشم می‌خوردند. میزان سلول‌های زایای آپوتوتیک در گروه کنترل $2/58 \pm$

سلول‌های لوکمی انسانی می‌شود [۱۸]. همچنین ناندا و همکاران در سال ۲۰۰۴ طی آزمایشی به این نتیجه رسیدند که سرکه برنج ژاپنی نیز بصورت وابسته به دوز باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود [۱۹]. سکی و همکاران در بررسی دیگری نشان دادند که موش‌های تغذیه شده با سرکه سوچوآ که با سلول‌های توموری سارکوما انکوبه شده بودند در مقایسه با گروه کنترل خود، سایز تومورشان کاهش یافت [۲۴].

نتیجه گیری

بطور کلی نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که مصرف غذای پرچرب با روغن کانولا در طی ۲۲ هفته باعث کاهش روند اسپرمیوژن بدون تأثیر بر روند اسپرماتوسیتوژن می‌شود، چرا که فقط سلول‌های اسپرماتید دراز کاهش یافتند. همچنین مصرف غذای پرچرب باعث کاهش پارامترهای اسپرم مانند شمارش و حرکت و مورفولوژی می‌شود. ضمن این که مصرف روزانه سرکه سیب با غلظت ۵٪ طی ۶ هفته بصورت خوراکی همراه آب آشامیدنی باعث بهبود روند اسپرمیوژن و پارامترهای اسپرم از طریق کاهش آپوپتوز بافت بیضه، افزایش تستوسترون و افزایش ظرفیت تام آنتی اکسیدانی سرم و کاهش وزن می‌شود. نظر به اینکه سرکه‌ها ارزان و در دسترس هستند و عوارض جانبی مصرف سرکه همراه با غذا نشان داده نشده، بنابراین استفاده روزانه سرکه سیب مخصوصاً در افراد چاق همراه با آب نوشیدنی جهت کاهش عوارض چاقی و بخصوص افراد در معرض ناباروری توصیه می‌گردد. مواردی چون ارزیابی گنادو تروپین‌ها، رسپتورهای آندروژنیک و استروژنیک بر روی سلول‌های موجود بر بافت بیضه، ارزیابی فرا ساختاری سلول‌های زایا و مطالعات ژنتیکی و مولکولی بدنبال مصرف غذای پر چرب و سرکه از جمله مواردیست که برای مطالعات بعدی پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزارى

بدینوسیله از مرکز تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی گیلان جهت حمایت مادی این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد. ضمناً نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تعارض نمی‌باشد.

کاهش تستوسترون همچنین می‌تواند بر روی پارامترهای اسپرم مؤثر باشد چرا که سلول‌های پوششی اپیدیدیم بطور کامل وابسته به تستوسترون می‌باشند. در مطالعه ما نیز این تغییرات مشاهده می‌شدند. شاید بتوان یکی از دلایل احتمالی کاهش تستوسترون را کاهش میزان آنتی اکسیدانی سرم گروه پر چرب دانست که یافته‌های ما تأیید کننده این مطلب بود. در همین رابطه نشان داده شده است که - افزایش استرس اکسیداتیو که اولین اثر آن بر روی غشای میتوکندری است، که در انجا همراهی بین اعضای پرو و آنتی آپوپتوزی مانند خانواده Bcl2 و Bax تغییر می‌کند که این خود باعث آزاد سازی سیتو کروم c و فعال شدن خانواده کاسپاز ها و در نهایت فراگماتنه شدن DNA می‌شود [۳۴]. دیگر مکانیسم‌های احتمالی کاهش تستوسترون عبارتند از: الف- آسیب پاتولوژیک به سول‌های لیدیک که منبع اصلی تولید تستوسترون هستند. ب- افزایش تعداد سلول‌های چربی و در نتیجه افزایش ترشح سیتو کین ها مانند لپتین که خود در کاهش تستوسترون مؤثر است [۳۴].

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که رژیم پرچرب باعث افزایش آپوپتوز در بافت بیضه گردید که درمان با سرکه سیب کاهش معناداری در تعداد سلول‌های آپوپتوتیک نسبت به گروه رژیم پرچرب، ایجاد نمود. شاید بتوان علت افزایش آپوپتوز را به افزایش استرس اکسیداتیو در گروه پرچرب نسبت داد که مطالعه مانیز بیانگر کاهش میزان آنتی اکسیدان در سرم گروه پر چرب بود. بطور مشابهی درمان با متفورمین در موش‌های تحت رژیم پر چرب نیز باعث کاهش آپوپتوز بیضه و کاهش استرس اکسیداتیو می‌گردد [۳۵]. مطالعه حاضر نشان داد که سرکه سیب توانست باعث بهبود پارامترهای اسپرم، کاهش آپوپتوز و افزایش آنتی اکسیدان سرم شود. شاید بتوان این تغییرات را به خاصیت آنتی اکسیداتیو سرکه‌ها نسبت داد. در این زمینه نشان داده شده که سرکه سیب دارای ترکیبات فنولیک بالایی در مقایسه با سایر سرکه‌هاست [۳۶].

مطالعات انجام شده با استفاده از سرکه‌های مختلف نشان دهنده اثر آپوپتوتیک ترکیبات فنلی می‌باشد. طی مطالعه‌ای *in vitro* که در ژاپن در سال ۲۰۰۴ توسط می‌مورا و همکاران انجام گرفت، نشان داده شد که سرکه نیشکر باعث آپوپتوز

REFERENCES

1. Campagne DM. Can Male Fertility Be Improved Prior to Assisted Reproduction through The Control of Uncommonly Considered Factors? *Int J Fertil Steril*. 2013;6(4):214-23. PMID: 24520443
2. Erdemir F, Atilgan D, Markoc F, Boztepe O, Suha-Parlaktas B, Sahin S. [The effect of diet induced obesity on testicular tissue and serum oxidative stress parameters]. *Actas Urol Esp*. 2012;36(3):153-9. DOI: 10.1016/j.acuro.2011.06.019 PMID: 21959063
3. Marques CM, Motta VE, Torres TS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effects of exercise training (treadmill) on insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in high-fat fed C57BL/6 mice. *Braz J Med Biol Res*. 2010;43(5):467-75. PMID: 20490434
4. Gasteyger C, Larsen TM, Vercruyse F, Astrup A. Effect of a dietary-induced weight loss on liver enzymes in obese subjects. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(5):1141-7. PMID: 18469232
5. French S, Robinson T. Fats and food intake. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2003;6(6):629-34. DOI: 10.1097/01.mco.0000098086.40916.8d PMID: 14557792
6. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev*. 2010;23(2):270-99. DOI/10.1017 : S0954422410000168 PMID: 20977819
7. Li Y, Liu L, Wang B, Xiong J, Li Q, Wang J, et al. Impairment of reproductive function in a male rat model of non-alcoholic fatty liver disease and beneficial effect of N 3-fatty acid supplementation. *Toxicol Lett*. 2013;222(2):224-32. DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.05.644 PMID: 23747427
8. Pan M, Song YL, Xu JM, Gan HZ. Melatonin ameliorates nonalcoholic fatty liver induced by high-fat diet in rats. *J Pineal Res*. 2006;41(1):79-84. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2006.00346.x PMID: 16842545
9. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med*. 2006;36(4):327-58. PMID: 16573358
10. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000;45(3):528-37. PMID: 10728374
11. O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev*. 2001;22(3):289-318. DOI: 10.1210/edrv.22.3.0431 PMID: 11399746
12. Carreau S, Bouraïma-Lelong H, Delalande C. Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis. *Adv Med Sci*. 2012;57(1):31-6. DOI: 10.2478/v10039-012-0005-y PMID: 22440937
13. Hajshafiha M, Ghareaghaji R, Salemi S, Sadegh-Asadi N, Sadeghi-Bazargani H. Association of body mass index with some fertility markers among male partners of infertile couples. *Int J Gen Med*. 2013;6:447-51. DOI: 10.2147/IJGM.S41341 PMID: 23785240
14. Hammiche F, Laven JS, Twigt JM, Boellaard WP, Steegers EA, Steegers-Theunissen RP. Body mass index and central adiposity are associated with sperm quality in men of subfertile couples. *Hum Reprod*. 2012;27(8):2365-72. DOI: 10.1093/humrep/des177 PMID: 22693175
15. Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM, Cedenho AP, Bertolla RP, Fraietta R. Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity. *BJU Int*. 2012;110(6):863-7. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2011.10813.x PMID: 22300410
16. MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, Farquhar CM. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2010;16(3):293-311. DOI: 10.1093/humupd/dmp047 PMID: 19889752
17. Johnston CS, Gaas CA. Vinegar: medicinal uses and antiglycemic effect. *MedGenMed*. 2006;8(2):61. PMID: 16926800
18. Diggs LJ. Vinegar: The user friendly standard text, reference and guide to appreciating, making, and enjoying vinegar. USA: iUniverse; 2000.
19. Mohamed el OA, Mohamed SM, Mohamed KA. The effect of cider vinegar on some nutritional and physiological parameters in mice. *J Egypt Public Health Assoc*. 2001;76(1-2):17-36. PMID: 17216979
20. Shishebor F, Mansoori A, Sarkaki AR, Jalali MT, Latifi SM. Apple cider vinegar attenuates lipid profile in normal and diabetic rats. *Pak J Biol Sci*. 2008;11(23):2634-8. PMID: 19630216
21. Kondo T, Kishi M, Fushimi T, Ugajin S, Kaga T. Vinegar intake reduces body weight, body fat mass, and serum triglyceride levels in obese Japanese subjects. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009;73(8):1837-43. PMID: 19661687
22. Seok H, Lee JY, Park EM, Park SE, Lee JH, Lim S, et al. Balsamic Vinegar Improves High Fat-Induced Beta Cell Dysfunction via Beta Cell ABCA1. *Diabetes Metab J*. 2012;36(4):275-9. DOI: 10.4093/dmj.2012.36.4.275 PMID: 22950058
23. Gu X, Zhao HL, Sui Y, Guan J, Chan JC, Tong PC. White rice vinegar improves pancreatic beta-cell function and fatty liver in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Diabetol*. 2012;49(3):185-91. DOI: 10.1007/s00592-010-0184-6 PMID: 20514502
24. Seo KI, Lee J, Choi RY, Lee HI, Lee JH, Jeong YK, et al. Anti-obesity and anti-insulin resistance effects of tomato vinegar beverage in diet-induced obese mice. *Food Funct*. 2014;5(7):1579-86. DOI: 10.1039/c4fo00135d PMID: 24867606
25. Mimura A, Suzuki Y, Toshima Y, Yazaki S, Ohtsuki T, Ui S, et al. Induction of apoptosis in human leukemia cells by naturally fermented sugar cane vinegar (kibizu) of Amami Oshshima Island. *Biofactors*. 2004;22(1-4):93-7. PMID: 15630260
26. Nanda K, Miyoshi N, Nakamura Y, Shimoi Y, Tamura Y, Nishikawa Y, et al. Extract of vinegar "Kurosu" from unpolished rice inhibits the proliferation of human cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2004;23(1):69-75. PMID: 15149153
27. Seki T, Morimura S, Shigematsu T, Maeda H, Kida K. Antitumor activity of rice-shochu post-distillation slurry and vinegar produced from the post-distillation slurry via oral administration in a mouse model. *Biofact*. 2004;22(1-4):103-5.
28. Nishino H, Murakoshi M, Mou XY, Wada S, Masuda M, Ohsaka Y, et al. Cancer prevention by phytochemicals. *Oncology*. 2005;69 Suppl 1:38-40. DOI: 10.1159/000086631 PMID: 16210876
29. Nishidai S, Nakamura Y, Torikai K, Yamamoto M, Ishihara N, Mori H, et al. Kurosu, a traditional vinegar produced from unpolished rice, suppresses lipid peroxidation in vitro and in mouse skin. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000;64(9):1909-14. PMID: 11055395
30. Walker WH. Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis*. 2011;1(2):116-20. DOI: 10.4161/spmg.1.2.16956 PMID: 22319659
31. Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neil JD, editors. *The Physiology of Reproduction*. NewYork: Raven Press .1994 ;p. 1363-434.
32. Willems A, Batlouni SR, Esnal A, Swinnen JV, Saunders PT, Sharpe RM, et al. Selective ablation of the androgen receptor in mouse sertoli cells affects sertoli cell maturation, barrier formation and cytoskeletal development. *PLoS One*:(11)5;2010. e14168. DOI: 10.1371/journal.pone.0014168 PMID: 21152390
33. Meng J, Greenlee AR, Taub CJ, Braun RE. Sertoli cell-specific deletion of the androgen receptor compromises testicular immune privilege in mice. *Biol Reprod*. 2011;85(2):254-60. DOI: 10.1095/biolreprod.110.090621 PMID: 21543771
34. Zhao J, Zhai L, Liu Z, Wu S, Xu L. Leptin level and oxidative stress contribute to obesity-induced low testosterone in murine testicular tissue. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014.
35. Yan WJ, Mu Y, Yu N, Yi TL, Zhang Y, Pang XL, et al. Protective effects of metformin on reproductive function in obese male rats induced by high-fat diet. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(7):1097-104. DOI: 10.1007/s10815-015-0506-2 PMID: 26081124
36. Soltan SAS, Shehata MEM. Antidiabetic and hypocholesterolemic: Effect of different types of vinegar in rats. *Life Sci J*. 2012;9(4):2141-51.

Effect of Apple Vinegar on Spermatogenesis and Serum Total Antioxidant Status in Rats Under High Fat Diet

Kamran Rudkhaneei¹, Monireh Aghajanasab², Masumeh Abbasi¹, Fahimeh Mohammadghasemi^{3,*}

¹ MSc Student, Student Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

² Ph.D, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

³ Associate Professor of Anatomy, Cellular & Molecular Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

* Corresponding author: Fahimeh Mohammadghasemi, Associate Professor of Anatomy, Cellular & Molecular Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran, E-mail: parsahistolab@gmail.com

DOI: 10.21859/hums-23037

Received: 22.04.2016

Accepted: 29.08.2016

Keywords:

High Fat Diet
Obesity
Apple Vinegar
Antioxidant
Spermatogenesis

How to Cite this Article:

Rudkhaneei K, Aghajanasab M, Abbasi M, Mohammadghasemi F. Effect of Apple Vinegar on Spermatogenesis and Serum Total Antioxidant Status in Rats Under High Fat Diet. *Sci J Hamadan Uni Med Sci*. 2016;2(3):249-258. DOI: DOI: 10.21859/hums-23037

© 2016 Hamadan University of Medical Sciences.

Abstract

Introduction: Obesity and high fat diet (HFD) has side effects on male fertility. The aim of this study was to evaluate the effect of apple vinegar on spermatogenesis and serum total antioxidant status (TAS) in rats under HFD.

Methods: Twenty-four Wistar male rats were divided to three groups, including (n = 8): control, HFD, HFD + apple vinegar. The control group received 16.6 kcal/day and the other two groups received HFD containing 51.6 kcal/day. After 16 weeks, group 3 received %5 apple vinegar in drinking water orally for six weeks. At the end of the experiment, epididymis sperm parameters including: count, morphology and motility, were measured. Serum level of TAS, testosterone and estradiol was assayed with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Testicular apoptosis was assayed with terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick-end labeling (TUNEL) and spermatogenesis was studied with quantitative histologic method. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test.

Results: Apple vinegar increased count and forward motility of sperms, when compared with HFD (P < 0.05). However, it was not effective on morphology. Numbers of apoptotic cells reduced in the vinegar-treated group (P < 0.001). Vinegar increased serum levels of testosterone and TAS compared with HFD (P < 0.05). However, estradiol level was not changed. Vinegar reduced the Lee index, when compared with HFD (P < 0.001). The numbers of spermatogonia, primary pachytene and leptotene spermatocyte, and round spermatids were not changed. However, the numbers of elongated spermatids were increased compared with HFD (P < 0.05).

Conclusions: This study indicated that daily use of apple vinegar in rats under HFD for six weeks improved spermatogenesis through reduction of testis apoptosis, increasing serum TAS and testosterone.