مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ۱، ۱۲۰-۱۱۱
Journal of Veterinary Research. 72,1:111-120, 2017
Original Article

اثر تجویز خوراکی شیر گاوهای آبستن بر اسپرماتوژنز موش‌های صحرایی نر

زینب حمیدیا[۱] پرویز تاجیک[۲] مرتضی زنده دل[۱*] امید دزفولیان[۳] فرهنگ ساسانی[۴]

۱) گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲) گروه مامایی و بیماری‌های تولید مثل، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
۴) گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۲۷ مرداد ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۱۸ آبان ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: امروزه ناباروری یکی از مشکلات بزرگ جوامع بشری می‌باشد. **هدف:** بررسی اثرات تجویز خوراکی شیر مخلوط گاوداری و شیر گاوهای آبستن سنگین بر اسپرماتوژنز موش‌های صحرایی نر. **روش کار:** موش‌های گروه اول از روز ۱ بارداری تا پایان شیردهی و سپس فرزندان نرآن‌ها تا بلوغ با شیر گاوهای آبستن سنگین گاواژ شدند. موش‌های گروه دوم از روز ۱۲ بارداری تا ۱۵ روز بعد از زایمان با شیر گاوهای آبستن سنگین گاواژ شدند. موش‌های گروه سوم از روز ۱ بارداری تا پایان شیردهی و سپس فرزندان نرآن‌ها تا بلوغ با شیر مخلوط گاوداری گاواژ شدند. موش‌های گروه چهارم از روز ۱۲ بارداری تا ۱۵ روز بعد از زایمان با شیر مخلوط گاوداری گاواژ شدند. موش‌های گروه شاهد در کل دوره پژوهش فقط با غذای مخصوص موش‌های صحرایی تغذیه شدند و در پایان توانایی زنده ماندن، انواع حرکت (پیشرونده، درجا و عدم تحرک) و شمار اسپرم‌ها و همچنین میزان تستوسترون خون موش‌ها بررسی گردید. **نتایج:** تجویز هر دو نوع شیر تأثیری بر حرکات درجا و همچنین توانایی زنده ماندن اسپرم‌های گروه‌های آزمایشی نداشت اما توانست سبب افزایش معنی‌دار عدم تحرک اسپرم‌ها و همچنین کاهش معنی‌دار شمار اسپرم گروه‌های آزمایشی گردد همینطور میزان تستوسترون خون گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار یافت. **نتیجه‌گیری نهایی:** به طور کل مشخص گردید مصرف شیر گاوهای آبستن سنگین و یا شیر مخلوط گاوداری که دارای استروژن بالایی باشد می‌تواند سبب تغییر برخی از ویژگی‌های اسپرم که در باروری جنس نر دخیل‌اند گردند.

واژه‌های کلیدی: شیر، استروژن، اسپرماتوژنز، ناباروری

مقدمه

ناباروری در سرتاسر جهان با سرعت زیادی در حال گسترش می‌باشد. در طی قرن گذشته ابتلا به سرطان بیضه در حال افزایش وکیفیت اسپرم در حال کاهش بوده است و از آنجایی که این کاهش سلامتی دستگاه تولید مثلی مردان قدمت زیادی نداشته و از طرف دیگر در بسیاری از کشورها نیز اتفاق افتاده است Sharpe و Skakkebaek پیشنهاد دادند که این ناهنجاری‌ها، انعکاس اثرات نامطلوب ناشی از محیط می‌باشد. اسپرماتوژنز، فرآیندی ضروری در قدرت باروری مردان است که روند پیچیده‌ای دارد (۱۴). تعداد اسپرم در مردان امروزی به مراتب کمتر از تعداد اسپرم مردانی است که ۵۰ سال گذشته زندگی می‌کردند. به همین دلیل امروزه ناباروری مردان یکی از مشکلات جوامع بشری و بویژه جوامع صنعتی است (۲۰).

گفته می‌شود که سموم محیطی و مواد شیمیایی عملکرد دستگاه تولید مثلی مردان را تغییر می‌دهد. یکی از علل رایج، وجود ترکیبات استروژنیک در محیط و از جمله در غذاهای مورد استفاده، بویژه غذاهای با خاستگاه دامی می‌باشد. در این بین، شیر و فرآورده‌های لبنی از اهمیت ویژهی برخوردارند و حدود ۷۰-۶۰٪ استروژن مصرفی را شامل می‌شوند (۹). Yaida در سال ۱۹۲۹ و Nigeon ، Ratsimamanga و Rabinowiez در سال ۱۹۵۶ اولین افرادی‌اند که وجود هورمون‌ها را در شیر گاوها گزارش کردند (۱۵).

فاکتورهای مغذی موجود در شیر با کمک به رشد استخوان‌ها، قرن‌هاست که این ماده غذایی را در سبد غذایی انسان‌ها گنجانده است و به همین دلیل دو گروه ویژه جامعه یعنی زنان باردار و کودکان به خوردن این نوشیدنی جهت رفع نیازهای کلسیمی شان تشویق می‌گردند (۱۹).

امروزه تولید شیر یک گاو از میزان یک لیتر در روز قرن ۱۸ ام به حدود ۳۵kg در روز در مزارع صنعتی گاو شیری رسیده است. گاوهای شیری انتخاب ژنتیکی شده امروزی که تغذیه‌شان با ترکیبی از کنسانتره و علف صورت می‌گیرد، قادرند در نیمه آخر آبستنی و تا روز ۲۲۰ آبستنی نیز تولید شیرداشته باشند در حالیکه در گذشته گاوها فقط از مرتع تغذیه می‌شدند. امروزه انسان‌ها شیری را که از گاو آبستن سنگین گرفته می‌شود مورد مصرف قرار می‌دهند و تخمین زده می‌شود که ۷۵٪ از شیر تجاری از گاوهای آبستن تأمین می‌شود، یعنی هنگامیکه میزان استروژن‌ها در گاو بسیار بالاست که علت این موضوع افزایش نیاز جامعه به این محصول می‌باشد. در ضمن فرآیند پاستوریزه کردن قادر به از بین بردن و یا کاستن غلظت استروژن شیر نمی‌باشد (۲۲).

کمسیون مشترک FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) میزان دریافت استرادیول قابل قبول روزانه را ۰-۵۰ng/kg/BW اعلام کرده است. در نتیجه میزان استرادیول دریافتی از فرآورده‌های لبنی بالاتر از میزان استاندارد اعلام شده می‌باشد (۲۳). غلظت استرون سولفات که استروژن

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۶۱۱۱۷۱۸۶-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: zendedel@ut.ac.ir

اصلی شیراســت، در ۴۸ ساعت آخر آبستنی به حد ۱۷ng در هرمیلی لیتر شــیر می‌رســد بنابراین اگر روزانه یک فنجان شــیر مصرف شود ۷۰۰ng استرون سولفات وارد بدن می‌گردد، این میزان ۵۰۰ الی ۱۰۰۰ برابر بیشتر از میزان استروژن مجاز در یک فرد سالم می‌باشد (۲۴).

با وجود اینکه اســتروژن‌ها در شــیرهای امروزی ممکن اســت برای جلوگیری از پوکی اســتخوان مناســب باشند، اما در پســران نابالغ در دوره بحرانی رشــد و نمو اندام‌های جنســی، منجر به کاهش کیفیت اسپرم در بزرگسالی می‌گردد (۹) و به دلیل آسیب‌پذیرتر بودن دوران جنینی و کودکی به فعالیت هورمون‌های جنسی، نگرانی‌های ویژهی در مورد مواجهه جنین و افراد نابالغ وجود دارد. چرا که سطح استروئیدهای جنسی با خاستگاه داخلی در پسران نابالغ، بسیار پایین است و حتی یک تغییر جزئی می‌تواند دگرگونی بزرگی را موجب شود (۱).

با توجه به مطالب فوق این پژوهش با هدف بررسی اثر تجویز خوراکی شــیر گاوهای آبســتن ســنگین و شــیر مخلوط گاوداری بر روی برخی از ویژگی‌های اسپرم در مدل موش‌های صحرایی در راستای تکمیل مطالعات قبلی طراحی شده است.

مواد و روش کار

در این پژوهش تجربی از موش‌های صحرایی ماده آبستن نژاد ویستار که از بخش حیوانات آزمایشــگاهی دانشــکده دامپزشکی دانشگاه تهران خریداری گردید اســتفاده شــد. حیوان‌ها در قفس‌های پلاستیکی در اتاق حیوانات با درجه حرارت ۲۲±۲°C و نور کنترل شــده ۱۲ ســاعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی با دسترسی کامل به آب و غذای کافی نگهداری شدند. در این پژوهش کلیه اصول اخلاقی کار با حیوان‌های آزمایشگاهی رعایت شده است (۲۰).

شــیر اســتفاده شــده در این پژوهش قبل از تجویز به حیوانات جهت اندازه‌گیری میزان استروژن به آزمایشگاه انتقال داده شد. استروژن موجود در شیر بوسیله روش کمی لومینسانس و با استفاده از کیت Abott ساخت شرکت مدلینگ آمریکا اندازه‌گیری شد.

شــیرهای مورد اســتفاده در این تحقیق شامل شــیر مخزن با میزان اســتروژن ۱۶/۲pg/mg> و شیر گاوهای ۷ ماه آبستن با مبوسیله میزان استروژن ۲۸/۷pg/mg بود.

موش‌های آبستن در ۵ گروه تقسیم شدند (در هر گروه ۳ حیوان):

گروه کنترل: که در کل دوران بارداری و پس از آن کل دوران شیردهی فقط با غذای مخصوص موش‌های صحرایی تغذیه شدند و سپس تحقیقات بعــدی بر روی نوزادان نر آن‌ها (n=۶) صــورت گرفت. نوزادان پس از طی دوران شیرخوارگی تغذیه عادی را داشتند.

گروه اول: که در کل دوران بارداری و پس از آن کل دوران شــیردهی هر روز علاوه بر غذای روزانه با شیر گاو آبستن سنگین گاواژ شدند (۱۰۰g/ ۲cc) و ســپس نوزادان نر آن‌ها (n=۶) پس از طی دوران شیرخوارگی تا زمان بلوغ (۱۰۰ روزگی) هر روز شیر گاو آبستن سنگین را دریافت کردند.

گــروه دوم: کــه از روز ۱۲ بارداری تــا ۱۵روز بعد از زایمان (همزمان با تشــکیل بیضه‌ها در موش صحرایی نر) هر روز با شیر گاو آبستن سنگین علاوه بر غذای روزانه گاواژ شدند و سپس تحقیقات بعدی بر روی نوزادان نر آن‌ها (n=۶) صورت گرفت.

گروه سوم: که در کل دوران بارداری و پس از آن کل دوران شیردهی هر روز علاوه بر غذای روزانه با شــیر مخزن شیردوشــی گاواژ می‌شدند و ســپس نوزادان نر آن‌ها (n=۶) پس از طی دوران شیرخوارگی تا زمان بلوغ (حدود ۱۰۰ روزگی) هر روز شیر مخزن شیردوشی را دریافت کردند.

گــروه چهارم: که از روز ۱۲ بارداری تــا ۱۵روز بعد از زایمان هر روز با شیر مخزن شیردوشی (علاوه بر غذای روزانه) گاواژ شدند و سپس تحقیقات بعدی بر روی نوزادان نر آن‌ها (n=۶) صورت گرفت.

تیمارها به صورت دهانی و بوسیله گاواژ انجام گرفت. شیر از گاوهای آبســتن ســنگین (۶ ماه بــه بالا) مؤسســه تحقیقاتی امین آباد دانشــکده دامپزشــکی تهیه شد و پس از عمل پاســتوریزه کردن، مورد استفاده قرار گرفت. شــیرها در کل زمان پژوهش در دمای ۸۰°C- (۷) نگهداری شدند. در تمام مدت انجام پژوهش غذا (پلیت‌های تجاری مخصوص تهیه شــده از شرکت خوراک دام پارس، تهران) و آب بدون هیچ محدودیتی در اختیار حیوانات قرارگرفت.

بررســی زایمان‌ها: بعد از گذشــت ۳ هفته از آغاز بارداری موش‌های ماده زایمان‌ها از لحاظ شمار نوزاد و مرده یا زنده بودن نوزادها مورد بررسی قرارگرفت.

در پایان دوره تیمار، حیوان‌ها وزن و بوسیله اتر بی هوش شدند و پس از خونگیری از قلب، کشته می‌شدند. ابتدا تمامی اعضای دستگاه تولید مثلی از لحاظ ظاهری بررسی شد سپس ناحیه دمی و مقداری از بدنه اپی دیدیم‌ها جدا شــد تا جهت آنالیزهای اســپرم که در زیر به آن اشاره شده است مورد استفاده قرار گیرند.

انــدازه گیری تستوســترون ســرم: پس از خونگیــری کامل از قلب، خون حیوان جهت انجام ســانتریفیوژ (دور ۴۰۰۰g و مدت زمان ۱۵ دقیقه) و جداســازی سرم به آزمایشــگاه منتقل شد. ســرم تا زمان بررسی میزان تستوسترون در فریزر ۸۰°C- نگهداری شد (۲۶) و سپس تستوسترون سرم با روش کمی لومینســانس و با اســتفاده از کیت دیافورین ساخت شرکت دیافورین ایتالیا مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

بررسی اسپرم: اپی دیدیم خارج شده از هر حیوان (ناحیه دم و مقداری از بدنه) به ســر عت به پلیت حاوی ۱ml محیط کشــت RPMI-۱۶۴۰ و همچنین میزان ۱۰۰mg به ازای هر ۱cc محیط کشــت BSA، به داخل انکوباتور ۳۷°C انتقال داده می‌شد.

توانایی زنده ماندن اسپرم: بررسی توانایی زنده ماندن اسپرم‌های هر

گروه براساس دستورالعمل ارائه شده بوسیله WHO با رنگ‌آمیزی ائوزین -نگروزین انجام می‌شود. ابتدا یک حجم مخلوط محیط کشت و اسپرم با دو حجم ائوزین مخلوط و پس از گذشت زمان ۳۰ ثانیه نگهداری در انکوباتور ۳۷°C، حجم مساوی از نگروزین به مخلوط ساخته شده اسپرم و ائوزین اضافه می‌شود. سپس گسترش‌های نازکی از مخلوط تهیه و پس از خشک شدن در دمای آزمایشگاه بوسیله میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی × ۱۰۰۰ شمار ۲۰۰ اسپرم در میدان‌های مختلف میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند. در این رنگ‌آمیزی سر اسپرم‌های زنده به رنگ سفید و سر اسپرم‌های مرده به رنگ قرمز دیده می‌شود (۲۰).

بررسی حرکات اسپرم‌ها: سنجش حرکات اسپرم براساس دستورالعمل ارائه شده بوسیله WHO انجام شد. به طور خلاصه ۱۰μl مخلوط محیط کشت (RPMI) و اسپرم بر روی لام قرار گرفت. دست کم ۵ میدان میکروسکوپی جهت ارزیابی حرکت ۲۰۰ اسپرم از هرنمونه بوسیله میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ×۲۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. سپس درصد سه نوع طرح حرکتی در اسپرم شامل اسپرم‌های با حرکت پیش رونده، اسپرم‌ها با حرکات درجا و اسپرم‌های غیرمتحرک محاسبه گردید (۲۰).

شمارش اسپرم: یک قطره از مخلوط محیط کشت و اسپرم بر روی لام هموسیتومتر نئوبار قرار گرفت و سپس شمار اسپر مها با ضریب $۱۰^{۶}$ در میلی لیتر محاسبه گردید. شمارش اسپرم براساس دستورالعمل ارائه شده از طرف سازمان جهانی بهداشت WHO محاسبه گردید (۲۰).

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج به دست آمده بوسیله نرم افزار spss به روش بررسی واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. و برای تعیین جایگاه اختلاف معنی‌دار در بین گروه‌ها از آزمون چند مرتبه‌ای دانکن (DMRT) استفاده شد. درجه معنی‌داری به میزان ($p<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

نتایج

میزان استروژن موجود در شیرهای آبستن سنگین و شیر مخلوط گاوداری: میزان استروژن موجود در شیر ۴ گاو آبستن سنگین و ۲ گاو غیر آبستن و همچنین استروژن موجود در یک نمونه از شیر مخزن شیردوشی بر حسب پیکومول در میلی لیتر نشان داده شده است. براساس نتایج به دست آمده میزان استروژن شیر گاوهای غیر آبستن و شیر مخزن شیردوشی کمتر از ۱۶/۲pg/ml و شیر گاوهای آبستن سنگین با تفاوت معنی‌داری بیشتر از این مقدار بود (میانگین استروژن در این شیرها ۲۸/۷۲pg/ml اندازه‌گیری شد) (جدول ۱).

اثرات شیر دارای استروژن بالا و شیر مخلوط گاوداری بر روی حرکات رو به جلوی اسپرم‌ها: بررسی نتایج حاصل از تأثیر تجویز دهانی شیر دارای استروژن بالا وهمچنین تجویز سه ماهه شیر مخلوط گاوداری بر روی

جدول ۱. میزان استروژن شیر گاوهای آبستن سنگین و غیرآبستن و شیر مخزن شیردوشی.

نوع شیر	میزان استروژن pg/ml
شیر گاو آبستن سنگین (۶ ماه)	۲۴/۱
شیر گاو آبستن سنگین (۶ ماه و ۱۹ روز)	۴۰/۵
شیر گاو آبستن سنگین (۶ ماه و ۱۵ روز)	۱۸/۹
شیر گاو آبستن سنگین (۶ ماه و ۱۹ روز)	۳۱/۴
شیر گاو غیر آبستن	<۱۶/۲
شیر گاو غیر آبستن	<۱۶/۲
شیر بالک (مخزن شیردوشی)	<۱۶/۲

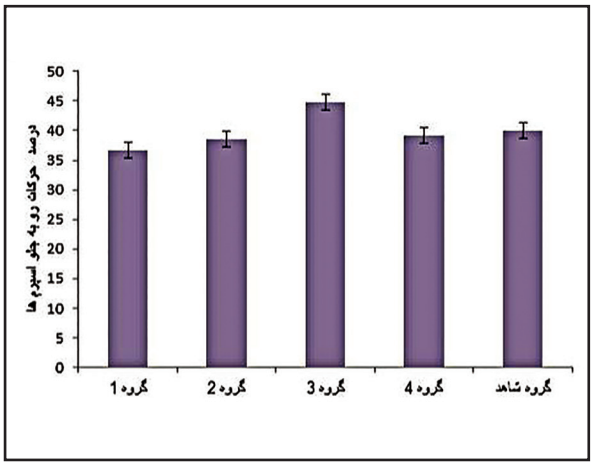
حرکات رو به جلوی اسپرم‌ها نشان داد که تجویز این دو نوع شیر باعث به وجود آمدن اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی و همچنین بین گروه‌های آزمایشی با گروه شاهد (هیچ نوع شیری در کل دوره دریافت نکرده و فقط با غذای مخصوص موش‌ها تغذیه شده‌اند) نگردیده است ($p>۰/۰۵$) (نمودار ۱).

اثرات شیر دارای استروژن بالا و شیر مخلوط گاوداری بر روی حرکات درجای اسپرم‌ها: نمودار ۲ نشان می‌دهد که تجویز دهانی شیر دارای استروژن بالا باعث بوجودآمدن اختلاف معنی‌دار بین گروه ۱ (دریافت کننده شیر گاوهای آبستن سنگین در کل دوره) و گروه ۲ (دریافت کننده شیر گاوهای آبستن سنگین فقط در دوره حساس تشکیل بیضه‌ها) شده است ($p<۰/۰۵$) و حرکات درجای اسپرم‌های گروه ۲ نسبت به گروه ۱ افزایش چشمگیری یافته است ($p<۰/۰۵$) همچنین حرکات درجای اسپرم‌های گروه ۱ با اختلاف معنی‌داری از گروه شاهد کمتر شده است ($p<۰/۰۵$) اما گروه ۲ اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد نشان نداد ($p<۰/۰۵$).

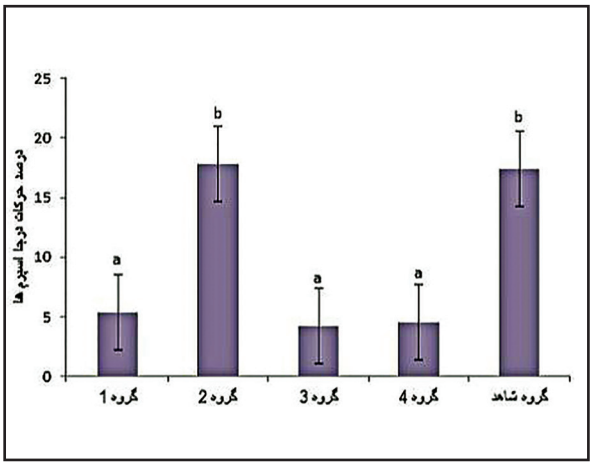
همچنین این نمودار بیانگر این مطلب است که تجویز شیر مخلوط نیز باعث ایجاد اختلاف معنی‌دار گروه‌های ۳ (دریافت کننده شیر مخلوط گاوداری در کل دوره) و ۴ (دریافت کننده شیر مخلوط گاوداری فقط در دوره حساس تشکیل بیضه‌ها) با گروه شاهد شده است ($p<۰/۰۵$) و حرکات درجای اسپرم‌های این دو گروه نیز نسبت به گروه شاهد کاهش بارزی را نشان داد ($p<۰/۰۵$) اما سبب بوجود آمدن اختلافی بین گروه‌های ۳ و ۴ نگردیده است ($p<۰/۰۵$) (نمودار ۲).

اثرات شیر دارای استروژن بالا و شیر مخلوط گاوداری بر روی عدم تحرک اسپرم‌ها: تجویز دهانی شیر دارای استروژن بالا و شیر مخلوط گاوداری طبق نمودار ۳ باعث بوجود آمدن اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی نشده است ($p<۰/۰۵$) اما وجود اختلاف بین گروه‌های آزمایشی و گروه شاهد مشهود است ($p<۰/۰۵$) و میزان عدم تحرک اسپرم‌های گروه شاهد با اختلاف معنی‌داری از گروه‌های آزمایشی کمتر بوده است ($p<۰/۰۵$) (نمودار ۳).

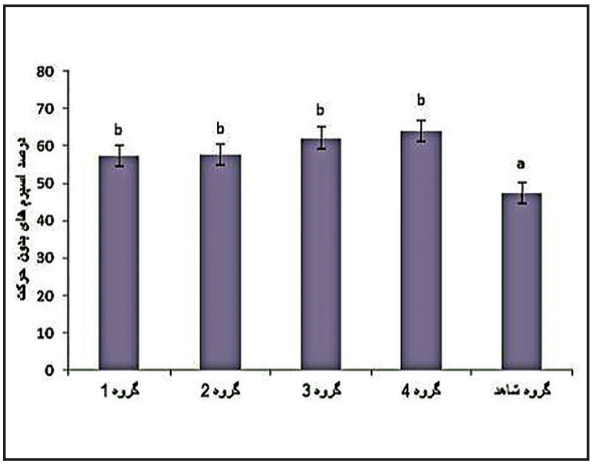
اثرات شیر دارای استروژن بالا و شیر مخلوط گاوداری بر روی شمار اسپرم‌ها: در بررسی نتایج حاصل از تأثیر تجویز دهانی شیر دارای استروژن بالا و شیر مخلوط گاوداری بر روی شمار اسپرم‌ها متوجه می‌شویم که



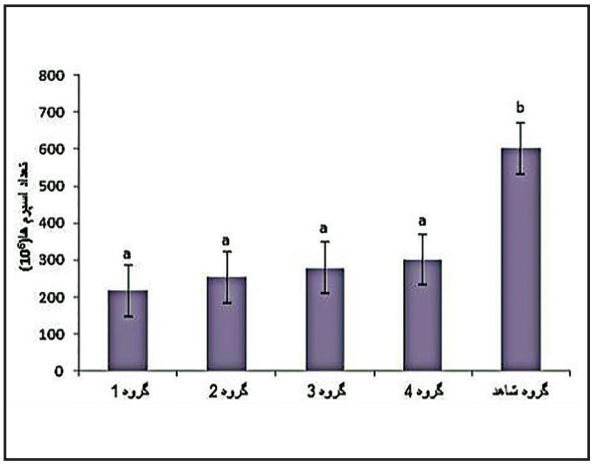
نمودار ۱. درصد حرکات رو به جلو اسپرم‌های گروه‌های آزمایشی در اثر تجویز شیر گاوهای آبستن سنگین و شیر مخلوط گاوداری و مقایسه آن با گروه شاهد (p<۰/۰۵). گروه ۱: از روز اول بارداری تا پایان شیردهی و سپس فرزندان نرشان تا بلوغ با شیر گاوهای آبستن سنگین گاواژ شدند. گروه ۲: از روز ۱۲ بارداری تا ۱۵ روز بعد از زایمان با شیر گاوهای آبستن سنگین گاواژ شدند. گروه ۳: از روز اول بارداری تا پایان شیردهی و سپس فرزندان نرشان تا بلوغ با شیر مخلوط گاوداری گاواژ شدند. گروه ۴: از روز ۱۲ بارداری تا ۱۵ روز بعد از زایمان با شیر مخلوط گاوداری گاواژ شدند. گروه شاهد: در کل دوران پژوهش فقط با غذای مخصوص رتها تغذیه شدند.



نمودار ۲. درصد حرکات درجا اسپرم‌های گروه‌های آزمایشی در اثر تجویز شیر گاوهای آبستن سنگین و شیر مخلوط گاوداری و مقایسه آن با گروه شاهد. حروف نامشابه (a,b) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵). گروه ۱: از روز اول بارداری تا پایان شیردهی و سپس فرزندان نرشان تا بلوغ با شیر گاوهای آبستن سنگین گاواژ شدند. گروه ۲: از روز ۱۲ بارداری تا ۱۵ روز بعد از زایمان با شیر گاوهای آبستن سنگین گاواژ شدند. گروه ۳: از روز اول بارداری تا پایان شیردهی و سپس فرزندان نرشان تا بلوغ با شیر مخلوط گاوداری گاواژ شدند.
گروه ۴: از روز ۱۲ بارداری تا ۱۵ روز بعد از زایمان با شیر مخلوط گاوداری گاواژ شدند. گروه شاهد: در کل دوران پژوهش فقط با غذای مخصوص رتها تغذیه شدند.



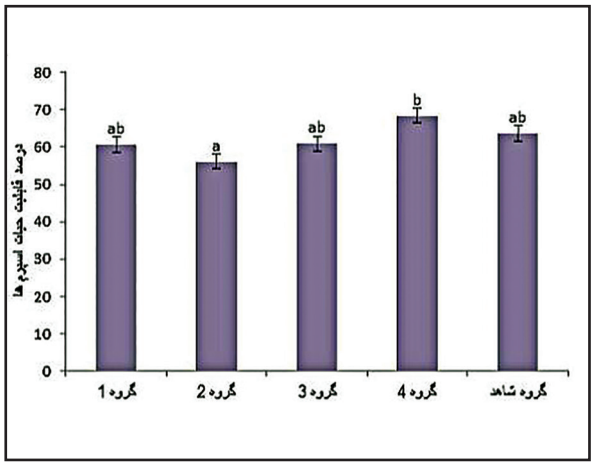
نمودار ۳. درصد اسپرم‌های بدون حرکت گروه‌های آزمایشی در اثر تجویز شیر گاوهای آبستن سنگین و شیر مخلوط گاوداری و مقایسه آن با گروه شاهد حروف نامشابه(a,b) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵). گروه ۱: از روز اول بارداری تا پایان شیردهی و سپس فرزندان نرشان تا بلوغ با شیر گاوهای آبستن سنگین گاواژ شدند. گروه ۲: از روز ۱۲ بارداری تا ۱۵ روز بعد از زایمان با شیر گاوهای آبستن سنگین گاواژ شدند. گروه ۳: از روز اول بارداری تا پایان شیردهی و سپس فرزندان نرشان تا بلوغ با شیر مخلوط گاوداری گاواژ شدند. گروه ۴: از روز ۱۲ بارداری تا ۱۵ روز بعد از زایمان با شیر مخلوط گاوداری گاواژ شدند. گروه شاهد: در کل دوران پژوهش فقط با غذای مخصوص رتها تغذیه شدند.



نمودار ۴. تعداد اسپرم‌های گروه‌های آزمایشی در اثر تجویز شیر گاوهای آبستن سنگین و شیر مخلوط گاوداری و مقایسه آن با گروه شاهد. حروف نامشابه (a,b) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵). گروه ۱: از روز اول بارداری تا پایان شیردهی و سپس فرزندان نرشان تا بلوغ با شیر گاوهای آبستن سنگین گاواژ شدند. گروه ۲: از روز ۱۲ بارداری تا ۱۵ روز بعد از زایمان با شیر گاوهای آبستن سنگین گاواژ شدند. گروه ۳: از روز اول بارداری تا پایان شیردهی و سپس فرزندان نرشان تا بلوغ با شیر مخلوط گاوداری گاواژ شدند. گروه ۴: از روز ۱۲ بارداری تا ۱۵ روز بعد از زایمان با شیر مخلوط گاوداری گاواژ شدند. گروه شاهد: در کل دوران پژوهش فقط با غذای مخصوص رتها تغذیه شدند.

تجویز این دو نوع شیر باعث بوجودآمدن اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی و گروه شاهد شده است (p<۰/۰۵) و شمار اسپرم در این گروه‌ها نسبت به گروه شاهد کاهش چشمگیری یافته است (p<۰/۰۵) از طرفی تجویز شیر نتوانست اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های آزمایشی ایجاد کند (p<۰/۰۵) (نمودار ۴).

اثرات شیر دارای استروژن بالا و شیر مخلوط گاوداری بر روی توانایی زنده ماندن اسپرم‌ها: طبق نمودار ۵ تجویز دهانی شیر دارای استروژن بالا و یا تجویز شیر مخلوط گاوداری باعث بوجود آمدن اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مصرف کننده این شیرها و همچنین بین این گروه‌ها با گروه شاهد نگردیده است (p<۰/۰۵). البته گروه ۲ (دریافت کننده شیر گاوهای آبستن سنگین فقط در دوره حساس تشکیل بیضه‌ها) با گروه ۴ (دریافت کننده شیر مخلوط گاوداری فقط در دوره حساس تشکیل بیضه‌ها) اختلاف



نمودار ۵. درصد قابلیت حیات اسپرم‌های گروه‌های آزمایشی در اثر تجویز شیر گاوهای آبستن سنگین و شیر مخلوط گاوداری و مقایسه آن با گروه شاهد. حروف نامشابه (a,b) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵). گروه ۱: از روز اول بارداری تا پایان شیردهی و سپس فرزندان نرشان تا بلوغ با شیر گاوهای آبستن سنگین گاواژ شدند. گروه ۲: از روز ۱۲ بارداری تا ۱۵ روز بعد از زایمان با شیر گاوهای آبستن سنگین گاواژ شدند. گروه ۳: از روز اول بارداری تا پایان شیردهی و سپس فرزندان نرشان تا بلوغ با شیر مخلوط گاوداری گاواژ شدند. گروه ۴: از روز ۱۲ بارداری تا ۱۵ روز بعد از زایمان با شیر مخلوط گاوداری گاواژ شدند. گروه شاهد: در کل دوران پژوهش فقط با غذای مخصوص رتها تغذیه شدند.

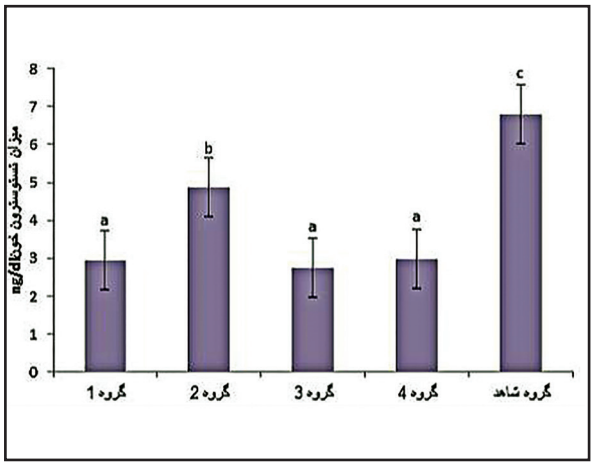
معنی‌داری را نشـان می‌دهند (p<۰/۰۵) و توانایی زنده ماندن اسپرم‌های گروه ۲ نسبت به گروه ۴ کاهش چشمگیری یافته است (p<۰/۰۵) (نمودار ۵).

اثرات شیر دارای استروژن بالا و شیر مخلوط گاوداری بر روی میزان تستوسترون سرم خون: همانطور که نمودار ۶ نشان می‌دهد تجویز دهانی شیر دارای استروژن بالا باعث بوجود آمدن اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های ۱ (دریافت کننده شـیر گاوهای آبستن سـنگین در کل دوره) و۲ (دریافت کننده شـیر گاوهای آبستن سنگین فقط در دوره حساس تشکیل بیضه‌ها) گردیده است (p<۰/۰۵) و میزان تستوسترون گروه ۱ با اختلاف معنی‌داری نسـبت به گروه ۲ کاهش یافته اسـت (p<۰/۰۵). اما تجویز شیر مخلوط گاوداری باعث بوجودآمدن اختلاف معنی‌دار بین گروه ۳ (دریافت کننده شیر مخلوط گاوداری در کل دوره) با گروه ۴ (دریافت کننده شیر مخلوط گاوداری فقط در دوره حساس تشکیل بیضه‌ها) نشده است (p<۰/۰۵). البته به طور کل تجویز شیر باعث بوجودآمدن اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی با گروه شاهد شـده است و میزان تستوسترون این گروه‌ها نسبت به گروه شاهد کاهش چشمگیری یافته است (p<۰/۰۵) (نمودار ۶).

بررسی زایمان‌ها: با تحت نظر گرفتن زایمان‌های گروه‌های آزمایشی و مقایسـه آن با گروه شـاهد متوجه دو مورد غیرطبیعـی در این زایمان‌ها بویژه در گروه‌هایی که مادران شیر استروژن بالا دریافت کرده بودند شدیم:

۱- وجود مرده‌زایی در زایمان‌ها: در هر زایمان از تعداد ۸ نوزاد حدود ۳ یا ۴ نوزاد مرده به دنیا آمدند.

۲- کاهش شمار نوزادان در هر زایمان



نمودار ۶. میزان تستوسترون خون گروه‌های آزمایشی در اثر تجویز شیر گاوهای آبستن سنگین و شیر مخلوط گاوداری و مقایسه آن با گروه شاهد. حروف نامشابه (a,b) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵). گروه ۱: از روز اول بارداری تا پایان شیردهی و سپس فرزندان نرشان تا بلوغ با شیر گاوهای آبستن سنگین گاواژ شدند. گروه ۲: از روز ۱۲ بارداری تا ۱۵ روز بعد از زایمان با شیر گاوهای آبستن سنگین گاواژ شدند. گروه ۳: از روز اول بارداری تا پایان شیردهی و سپس فرزندان نرشان تا بلوغ با شیر مخلوط گاوداری گاواژ شدند. گروه ۴: از روز ۱۲ بارداری تا ۱۵ روز بعد از زایمان با شیر مخلوط گاوداری گاواژ شدند. گروه شاهد: در کل دوران پژوهش فقط با غذای مخصوص رتها تغذیه شدند.

بحث

در این مطالعه به بررسـی اثر استروژن موجود در شیر گاوهای آبستن سنگین و همچنین شیر مخلوط گاوداری بر روی برخی از ویژگی‌های کمی و کیفی اسـپرم و همینطور میزان تستوسترون خون موش‌های نر پرداخته شد. مطالعاتی که پیشتر در این زمینه انجام شده‌اند همه به اثر فیدبک منفی اسـتروژن بر روی گنادوتروپین‌هـای هورمون محرک فولیکولی (FSH) و هورمـون لوتئینـی (LH) و تحت تأثیـر قرار دادن محـور هیپوتالاموس-هیپوفیز اشاره کرده‌اند. نقش FSH تنظیم تکثیر سلول‌های سرتولی است. سلول‌های سرتولی در درجه اول اهمیت در کنترل اسپرماتوژنز هستند، این سـلول‌ها مورد هدف FSH و آندروژن‌ها می‌باشند (۱۱). هر سلول سرتولی نیز شمار اندکی از سلول‌های زایا را در تبدیل به اسپرماتوزوآی بالغ حمایت می‌کند (۴). اسـپرماتوژنز بوسیله گنادوتروپین‌ها و دسته‌ای از عوامل داخل بیضه‌ای کنترل می‌گردد که یکی از این عوامل مهم، اسـتروژنی است که درون اپیتلیوم لوله‌های سـمینیفر، از آندروژن‌ها و با عمل آنزیمی آروماتاز سـاخته می‌شـود. سـلول‌های زایا یکی از منابع مهم تولید اسـتروژن‌ها و همچنین سـلول‌های هدف استروژن‌ها در بیضه هستند که البته در دوران جنینی این وظیفه بیشتر بر عهده سلول‌های سرتولی است. مطالعات نشان داده‌اند که آروماتاز و اسـتروژن دو عاملی‌اند که هم برای تشـکیل و بقای اسپرماتوژنز و هم برای بلوغ اسپرم‌ها در فرآیند اسپرماتوژنز مورد نیاز هستند و همچنین کیفیت اسپرم (مثل حرکت) را نیز تنظیم می‌کنند (۵).

نتایج مربوط به نمودار ۱ نشان داد که تجویز شیر گاوهای آبستن سنگین و شیر مخلوط گاوداری، نتوانست بر روی حرکات رو به جلوی اسپرم‌ها مؤثر باشد و تغییری در آن ایجاد کند. البته پژوهشی که Lubbert و همکاران

در سال ۱۹۹۲ بر روی یک مرد سالم ۳۶ ساله جهت بررسی اثر اتینیل استرادیول روی کیفیت اسپرم انجام دادند حاکی از تأثیر استروژن بر این ویژگی حرکتی اسپرم بود. آن‌ها نشان دادند وقتیکه یک رژیم دارای اتینیل استرادیول با دوز بالا (۶۰μl در هر روز) در اختیار این فرد گذاشته شود فقط با گذشت چند روز، شاهد کاهش این شاخص حرکتی در اسپرم‌ها خواهند بود (۱۷). نتایج حاصل از آزمایشات MA و همکاران در سال ۲۰۰۹ شبیه به پژوهش حاضر در رابطه با این الگوی حرکتی اسپرم‌ها بود. این محققین نشان دادند با تجویز روزانه ۱۰cc شیر به موش کوچک آزمایشگاهی به مدت ۱۳ هفته هیچگونه تغییری در تحرک اسپرم‌ها دیده نخواهد شد (۱۹).

براساس نتایج نشان داده شده در نمودار ۲ استفاده از شیر گاو آبستن سنگین توانست بر حرکت درجای اسپرم‌ها تأثیر گذاشته و سبب کاهش این حرکات در گروه ۱ نسبت به گروه ۲ شد. اسپرم‌های درجا زننده، زنده تلقی می‌گردند ولی قدرت حرکت رو به جلو و در نتیجه قدرت بارورسازی تخمک را ندارند از آنجاییکه طول دوران تیمار موش‌های گروه ۱ بسیار بیشتر از موش‌های گروه ۲ بوده است این اثر قابل توجیه است و می‌توان انتظار داشت که جمعیت اسپرم‌های متحرک، در اثر استروژن بالا کاهش یافته باشد و بر جمعیت اسپرم‌های ساکن افزوده شده باشد. همانطور که مشاهدات قبلی نیز نشان داده‌اند رژیم دارای میزان بالای استروژن باعث آپوپتوز سلول‌های زایا شده است (۲) و از آنجاییکه این سلول‌ها منبع مهم استروژن داخل بیضه‌ای هستند در نتیجه کیفیت اسپرم از جمله حرکت اسپرم دچار مشکل می‌شود (۵). بنابراین علت یکجا نشین شدن اسپرم‌ها در این پژوهش ناشی از تجویز شیر با استروژن بالا بود. در مطالعه‌ای که بوسیله Karbalay-Doust و همکاران در سال ۲۰۱۰ جهت بررسی عصاره گیاه بابونه بر روی اسپرم موش‌های صحرایی انجام گرفت نشان داده شد که تجویز این استروژن گیاهی به مدت ۸ هفته به موش‌ها به وسیله مسیر گفته شده می‌تواند سبب کاهش حرکات اسپرم‌ها شود (۱۶). درصد اسپرم‌های درجا زننده گروه ۲ در حد گروه شاهد بود و این موضوع نشان داد که تجویز حتی استروژن با دوز بالا اما به مدت ۲۵ روز نتوانست سبب تغییر این ویژگی حرکتی اسپرم گردد با اینکه این مدت کوتاه، دوره تشکیل بیضه‌ها است و با این حساب می‌توان حرکت درجا در این حد را در جمعیت اسپرم‌ها طبیعی دانست.

دوران تشکیل بیضه‌ها و به طور کل دوران قبل از بلوغ زمان حساسی است چرا که سطح استروئیدهای جنسی با خاستگاه داخلی در فرد بسیار پایین است و حتی یک تغییر جزئی می‌تواند دگرگونی بزرگی در فعالیت کلی هورمون محسوب گردد که در ویژگی‌های فنوتیپی فرد منعکس شود. در این زمان گیرنده‌های استروژن و آندروژن در بافت‌های حساس به هورمون‌های استرروئیدی بیان شده، یا در حال بیان شدن می‌باشند (۱). در ضمن دوران جنینی و قبل از بلوغ دوران حساس تشکیل اندام‌هاست (۸). گزارش شده است که در سلول‌های سرتولی موش‌های نابالغ در کنار گیرنده‌های استروژن، G پروتئین‌هایی بیان شده‌اند (GPER) که به کنترل فعالیت‌های ضد آپوپتوز این سلول‌ها می‌پردازند (۱۸). گزارش شده است که موش‌های نوزادی که تحت تأثیر استروژن قرار گرفته اند تغییرات هورمونی بارزی را در گنادوتروپین‌ها و آندروژن‌ها و همچنین تخریبی پایدار در اسپرماتوژنز را نشان داده‌اند (۱۱).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تجویز استروژن با مقدار بالا در دوره حساس تشکیل بیضه‌ها برخلاف تصورات ما تأثیر گذاری محسوسی نداشت ولی در دوره‌های بعدی توانست این ویژگی حرکتی اسپرم‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. تجویز شیر مخلوط گاوداری نیز توانست سبب کاهش حرکات درجای اسپرم‌های دو گروه مصرف کننده این شیر شود که نشان از وجود استروژن آن هم به میزانی بالاتر از میزان طبیعی در این شیرها و تأثیر آن بر این شاخص حرکتی بود اما عدم وجود تغییر معنی‌دار بین دو گروه مصرف کننده شیر مخلوط مشخص کرد که استروژن با دوز پایین تر فقط در دوره حساس تشکیل بیضه‌ها عمل خود را انجام داده و در دوران‌های بعدی به دلیل کاهش حساسیت حیوان نتوانست تغییری ایجاد کند.

با بررسی نتایج مربوط به نمودار ۳ می‌توان فهمید که تجویز شیر گاوهای آبستن سنگین و شیر مخلوط گاوداری در موش‌ها توانست سبب افزایش عدم تحرک اسپرم‌های گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه شاهد شود و این نشان داد که استروژن موجود در شیر توانست موجب ساکن شدن اسپرم‌ها شود (۵) البته در بین گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و جمع این نتایج حاکی از آن است که مصرف شیر حتی با میزان استروژن پایین نیز توانست در دوره حساس تشکیل بیضه اثر نموده و باعث افزایش شمار اسپرم‌های ساکن شود اما همین میزان استروژن اگر پس از دوران حساس تشکیل بیضه‌ها باز هم مورد استفاده قرار گیرد دیگر قادر به ایجاد تغییر نیست چرا که حساسیت به استروئیدها کاهش یافته است (۱) و اگر دوز استروژن دریافتی نیز بالاتر رود دیگر بیش از این تغییری ایجاد نمی‌کند. البته اسپرم ساکن صد در صد نشان‌دهنده اسپرم مرده نیست ولی نمی‌تواند تخمک را بارور سازد (۱۳). نتایج این پژوهش شبیه به نتایج پژوهشی است که بوسیله Gill-sharma و همکاران در سال ۲۰۰۱ بر روی موش‌های صحرایی نر بالغ صورت گرفت و دیده شد که حتی تجویز میزان اندک ۱۷- بتا استرادیول (۰/۱ μg) به صورت زیرجلدی و به مدت ۶۰ روز قادر به افزایش درصد اسپرم‌های ساکن و کاهش درصد اسپرم‌های متحرک بوده است (۱۲).

باتوجه به نتایج مربوط به نمودار ۴ تجویز هر دو نوع شیر توانایی کم کردن شمار اسپرم موش‌ها را نسبت به گروه شاهد داشته است که این نتایج باز هم نشان‌دهنده تأثیر استروژن موجود در شیرها و عملکرد آن از راه محور HPG و اثر آن بر روی سلول‌های سرتولی و در مرحله بعدی سلول‌های زایا و در نتیجه اسپرماتوژنز بوده است (۵) در اینجا نیز عدم وجود تغییر معنی‌دار در بین داده‌های گروه‌های آزمایشی نشان‌دهنده این مطلب

بود که حتی استروژن با دوز پایین در دوره حساس تشکیل بیضه‌ها توانست بر روی سلول‌های زایا تأثیر کرده و با افزایش آپوپتوز آن‌ها شمار اسپرم‌ها را کم کند (۲) مطالعاتی که بر روی جنین موش کوچک آزمایشگاهی صورت گرفت این گفته را تأیید کرد که تجویز دی اتیل استیل بسترول (DES) در زمان جنینی منجر به کاهش شمار اسپرم در بزرگسالی گشته است (۸) هر چند ادامه تجویز این نوع شیر (با استروژن پائین) به دلیل کاهش حساسیت گیرنده‌ها شدت تغییرات را افزایش نداد (۱) و همچنین استفاده از شیر با دوز بالاتر استروژن نیز تغییر شدیدتری را موجب نشد. در تحقیقی که بوسیله Assinder و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بر روی موش‌های صحرایی بالغ صورت گرفت نیز نشان داده شد که تجویز رژیم غذایی دارای استروژن‌های گیاهی به میزان بالا و به مدت ۲۴ روز قادر به کاهش شمار اسپرم از راه افزایش آپوپتوز سلو ل‌های زایا بوده است (۲). پژوهش Lubbert و همکارانش در سال ۱۹۹۲ برای بررسی اثر اتینیل استرادیول بر روی کیفیت اسپرم نشان داد تجویز رژیم دارای این ماده با دوز بالا توانست شمار اسپرم را بعد از گذشت ۲ هفته در فرد بالغ کاهش دهد (۱۷). اما در آزمایشات MA و همکارانش در سال ۲۰۰۹ که جهت بررسی اثر شیر بر اسپرم موش کوچک آزمایشگاهی انجام پذیرفت نشان داده شد که تجویز روزانه ۱۰cc شیر (شیر موجود در بازار) به مدت ۱۳ هفته نتوانست شمار اسپرم‌ها را تغییر دهد (۱۹).

نتایجی که از بررسی تأثیر تجویز شیر بر روی توانایی زنده ماندن اسپرم‌ها به دست آمد نشان داد که به طور کل تجویز شیر نتوانسته است اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های آزمایشی با گروه شاهد ایجاد کند و در نتیجه تأثیری بر این فاکتور داشته باشد. به بیان دیگر تجویز شیر فقط توانسته است توانایی حرکت اسپرم‌ها را کاهش دهد ولی بر توانایی زنده ماندنشان اثری نداشته است. البته مقایسه گروه‌های آزمایشی نشان داد که بین گروه ۲ با گروه ۴ اختلاف معنی‌دار وجود داشته است و وقتی این دو گروه که هر دو در دوران حساس تشکیل بیضه‌ها شیر دریافت کردند با یکدیگر مقایسه شدند نشان دادند که توانایی زنده ماندن اسپرم‌های گروهی که شیر استروژن بالا دریافت داشته‌اند نسبت به آن‌هایی که شیر مخلوط دریافت کردند کمتر بوده است. پس دریافت شیر با استروژن بالا آنهم در دوره حساس، زنده مانی اسپرم‌ها را تا حدی تغییر داده است. در مطالعاتی که بوسیله Tsakmakidis و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی محیط کشت اسپرم‌های گراز وحشی صورت پذیرفت نشان داده شد تجویز مایکو توکسین‌های استروژنی مثل زرالنون (ZEA) و α و β زرالنول (ZOL) توانسته است زنده مانی اسپرم‌های این حیوان را کاهش دهد (۲۷). پژوهش انجام گرفته بوسیله Çiftci و Zülkadir در سال ۲۰۱۰ بر روی محیط کشت اسپرم‌های گاو هولشتاین نشان داد که افزودن ۱۷-بتا استردیول با دوزهای پایین (۲ μg/ml و ۴) قادر به تغییر زنده مانی اسپرم‌ها نبوده اما اسپرم‌هایی که تحت تأثیر دوز بالای این استروژن بودند (۸ μg/ml) زنده مانیشان کاهش پیدا کرد. محققین این مقاله معتقد بودند دوز بالای ۱۷-بتا استرادیول برای بقای اسپرم‌ها مضر بوده است (۶) پژوهش حاضر نیز نشان داد که دوز بالای استروژن می‌تواند تهدیدی برای زنده ماندن اسپرم‌ها باشد.

بررسی میزان تستوسترون خون گروه‌های آزمایشی حاکی از تأثیر معکوس استروژن موجود در شیر بر روی GnRH و به دنبال آن گنادوتروپین LH بوده است. کاهش ترشح LH از راه کاهش تأثیر بر روی سلول‌های لیدیگ میزان تستوسترون را کم کرده است (۱۱). در کل، تجویز شیر چه با استروژن بالا و چه با استروژن پایین قادر به کاهش میزان تستوسترون نسبت به گروه شاهد بوده است. در این پژوهش میزان تستوسترون گروه ۱ که مدت طولانی تحت تأثیر استروژن با دوز بالا بوده‌اند نسبت به گروه ۲ کاهش یافته است. البته شیر مخلوط گاوداری نتوانسته است در دو گروه دریافت کننده این شیر تفاوتی ایجاد کند و این مسأله نشان داد که میزان کمتر استروژن در همان دوره حساس تشکیل بیضه تأثیر خود را بر روی سلول‌های لیدیگ گذاشته و در بقیه دوران نتوانسته تفاوتی را ایجاد کند که می‌تواند به دلیل کاهش حساسیت حیوان و جواب ندادن به میزان کمتر استروژن در دوره بعدی باشد (۱). در پژوهشی که بوسیله Bellido و همکاران در سال ۱۹۹۰ بر روی موش‌های صحرایی یک روزه انجام گرفت نشان داده شد که تزریق زیر جلدی استروژن (استرادیول بنزوآت) به مدت ۱۰ روز قادر به کاهش تستوسترون بوده است (۳) ولی نتایجی که از تحقیقات Seegers و همکاران در سال ۱۹۹۱ با تزریق روزانه ۴۰ng، ۱۷-بتا استرادیول به موش‌های صحرایی در مدت ۷ روز به دست آمد نشان داد که این میزان ناچیز استروژن قادر به کاستن میزان تستوسترون نبوده است (۲۵). در پژوهش Assinder و همکاران در سال ۲۰۰۷، تجویز غذای دارای استروژن‌های گیاهی بالا نتوانست میزان تستوسترون را تغییر دهد (۲) اما آنچه در تحقیقات Gill-sharma و همکاران در سال ۲۰۰۱ دیده شد تأییدی بر پژوهش حاضر است و نشان داد هنگامی که میزان ۱۰۰μg، ۱۷-بتا استرادیول به صورت زیر جلدی به مدت ۶۰ روز به موش‌های صحرایی بالغ تزریق گردید قادر به کاهش تیتر تستوسترون بود (۱۲). نتیجه پژوهش Tabrizi و همکاران در سال ۲۰۱۴ که جهت بررسی اثر عصاره زیتون (استروژن گیاهی) بر روی باروری موش‌های صحرایی نر بالغ صورت پذیرفت نشان داد که گاواژ روزانه این عصاره توانسته تستوسترون این حیوانات را کاهش دهد. استروژن‌های گیاهی دارای ترکیباتی‌اند که عملکردی شبیه به ۱۷- بتا استرادیول دارند (۲۶) همچنین تستوسترون فردی که Lubbert و همکاران در سال ۱۹۹۲ برای بررسی اثر اتینیل استرادیول بر روی هورمون‌ها و کیفیت منی او مورد آزمایش قرار داده بودند با تجویز میزان بالای این ماده کاهش یافت (۱۷).

با توجه به نتایج حاصل از بررسی زایمان‌ها وجود حدود ۴۰٪ مرده‌زایی در نسل اول و همچنین کاهش فرزندآوری در هر زایمان دیده شد. در پژوهشی که بوسیله Ganmaa و همکاران در سال ۲۰۰۴ جهت بررسی

اثرات شیر بر روی قابلیت‌های تولید مثلی موش‌های صحرایی انجام گرفت نشـان داده شد که موش‌های نر و ماده‌ای که به مدت ۱۰ هفته از شیر گاو اسـتفاده کردند و پس از این مدت با یکدیگر آمیزش داده شـدند و نسـل اول را تولیـد کردند در ظاهر تغیری در قابلیت‌های تولید مثلی و باروری و همچنین اختلالی در نمو اندام‌های جنسی صورت نگرفت بلکه تنها تغییری که دیده شد شمار زیادی مرده‌زایی در نسل اول بود (۱۰) وجود مرده زایی در نسل اول این پژوهش بسیار شبیه به نتایج زایمان‌های نسل اول موش‌های پژوهش حاضر بود.

در مجموع با کنار هم قرار دادن نتایج این پژوهش رد پای استروژن را چه در شیرهای آبستن سنگین و چه در شیرهای مخلوط گاوداری می‌توان به خوبی دید چرا که اثرات آن بر روی آپوپتوز سلول‌های زایا و کاهش شمار اسپرم‌ها و همچنین اثرات فیدبک منفی آن بر روی گنادوتروپین‌ها و کاهش شمار سلول‌های سرتولی و به دنبال آن کاهش کیفیت اسپرم از یک طرف و از طرف دیگر کاهش ترشـح تستوسـترون به خوبی آشکار است. قدرت باروری جنس نر را دستگاه تولید مثلی تعیین می‌کند. این دستگاه علاوه بر تولید اسـپرم‌های سالم باید توانایی ساخت هورمون‌های جنسی لازم برای تولید اسـپرم و تکامل جنسـی در دوران بلوغ را داشته باشد. Naslund و Coffey معتقدند که تجویز اسـتروژن در نوزادان می‌تواند روند تشکیل و همچنین پاسـخ به آندروژن‌ها را در غدد ضمیمه جنسـی به صورت دائمی تغییر دهد (۲۱). فردی بارور محسـوب می‌گردد که علاوه بر داشتن شمار بالای اسـپرم‌های زنده درصد زیادی اسپرم متحرک آنهم با حرکات رو به جلو داشته باشد. اسپرم زنده غیر متحرک و یا با حرکت‌های غیر پیشرونده قادر به بارورسـازی تخمک نمی باشد. در تحقیقات ما استروژن موجود در شـیر توانست شـمار اسـپرم‌ها را کم کرده و از درصد اسپرم‌های متحرک نیز بکاهد اگرچه نتوانسـت بر حرکات پیشـرونده اسـپرم‌ها مؤثر باشد و از طرفی شیر گاوهای آبستن سنگین قادر به کاهش اسپرم‌های زنده در دوره حساس تشکیل بیضه‌ها شد. از طرفی شیر باعث کاهش میزان تستوسترون شده اسـت. مجموع این عوامل باعث کم شدن قدرت بارورسازی تخمک می‌گردد. بیشـترین نگرانی در رابطه با مصرف شیر مخلوط گاوداری (شیر موجود در بازار) است که متأسفانه امروزه درصد بالایی از آن را شیر گاوهای آبسـتن سـنگین تشـکیل می‌دهد و از طرفی کودکان و زنان باردار که در موقعیت حساسی هستند بیشترین میزان مصرف شیر را به خود اختصاص داده‌اند. دوران قبل از بلوغ و دوران جنینی بسـیار حسـاس بوده و همانطور که نتایج نشان داد حتی میزان پایین استروژن‌ها ممکن است بتوانند سبب ایجاد تغییرات در این دوره شـوند البته به جز حرکات رو به جلو اسـپرم که حتی با دوز بالای استروژن هم دچار تغییر نشد و هچنین توانایی زنده ماندن اسپرم‌ها که فقط با دوز بالای استروژن در این دوره کاهش پیدا کرد. هرچند عوامل دیگری نیز در تخریب باروری اسپرم‌ها دخیل‌اند که در این پژوهش مورد بررسـی قرار نگرفتند و جهـت حذف این عوامل نیاز به آزمایشـات تکمیلی دیگری نیز می‌باشد.

به طور کل مشـخص گردید مصرف شیر گاوهای آبستن سنگین و یا شیر مخلوط گاوداری که دارای استروژن بالایی باشد می‌تواند سبب تغییر برخی از ویژگی‌های اسپرم که در باروری جنس نر دخیل‌اند گردند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که حمایت‌های مالی انجام طرح را عهده دار شد تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Aksglaede, L., Juul, A., Leffers, H., Skakkebæk, N.E., Andersson, A.M. (2006) The sensitivity of the child to sex steroids : possible impact of exogenous estrogens. Hum Reprod Update. 12: 341-349.
2. Assinder, S., Davis, R., Fenwick, M. ,Glover, A. (2007) Adult-only exposure of male rats to adiet of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells. Reproduction. 133: 11-19.
3. Bellido, C., Pinilla, L., Aguilar, R., Gaytan, F., Aguilar, E. (1990) Possible role of changes in post-natal gonadotrophin concentrations on permanent impairment of the reproductive system in neonatally oestrogenized male rats. J Reprod Fert. 90: 369-374.
4. Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N.E. (1995) Declining Semen Quality and Increasing Incidence of Testicular Cancer: Is There a Common Cause? Environ Health Perspect. 103: 137-139.
5. Carreau, S., Bouraima-Lelong, H., Delalande, Ch. (2011) Estrogens in male germ cells. Spermatogenesis. 1: 90-94.
6. Çiftci, H.B., Zülkadir, U. (2010) The effect of oestradiol-17β on the motility, viability and the acrosomal status of bull sperm. South African J Anim Sci. 40 :6-13.
7. Farlow, Daniel, W., Xu, Xia., Veenstra, Timothy, D. (2009) Quantitative measurement of endogenous estrogen metabolites, risk-factors for development of breast cancer, in commercial milk products by LC-MS/MS. J Chromatogr B. 877: 1327-1334.

8. Fisch, H.,Golden, R. (2003) Environmental estrogens and sperm counts. Pure Appl Chem. 75: 2181-2193.
9. Ganmaa, D., Wang, P.Y., Qin, L.Q., Hoshi, K., Sato, A. (2001) Is milk responsible for male reproductive disorders? Med Hypotheses. 57: 510-514.
10. Ganmaa, D., Qin, L., Wang, P., Tezuka, H., Teramoto, Sh., Sato, A. (2004) A two-generation reproduction study to assess the effects of cows' milk on reproductive development in male and female rats. Fertil Steril. 82: 1106-1114.
11. Gaytan, F., Pinilla, L., Aguilar, R., Lucena, M.C., Paaniagua, R. (1986) Effects of neonatal estrogen administration on rat testis development with particular reference to sertoli cells. J Androl. 7: 112-121.
12. Gill-sharma, M.K., Dsouza, S., Padwal,V., Balasinor, N., Aleem, M., Parte, P., Juneja, H.S. (2001) Antifertility effects of estradiol in adult male rats. J Endocrinol Invest. 24: 598-607.
13. Hwang, K., Walters, R.C., Lipshultz, L.I. (2011) Contemporary concepts in the evaluation and management of male infertility. Nat Rev Urol. 8: 86-94.
14. Jafarian, A., Akhondi, M., Pezhhan, N., Sadeghi, M.R., Zarnani, A.H., Salehkhou, Sh. (2008) Stimulatory Effects of Estradiol and FSH on the Restoration of Spermatogenesis in Azoospermic Mice. J Reprod Infertil. 9: 317-324.
15. Jouana, P.N., Pouliotb,Y., Sylvie, F., Gauthiera, L.J.P. (2006) Hormones in bovine milk and milk products:A Survey. Int Dairy J. 16: 1408-1414.
16. Karbalay-Doust, S., Noorafshan, A., Dehghani, F., Panjehshahin, M.R., Monabati, A. (2010) Effects of Hydroalcoholic Extract of Matricaria chamomilla on Serum Testosterone and Estradiol Levels, Spermatozoon Quality, and Tail Length in Rat. Iran J Med Sci. 35: 15-22.
17. Lubbert, H., Leo-Rossberg, I., Hammerstein, J. (1992) Effects of ethinyl estradiol on semen quality and various hormonal parameters in a eugonadal male. Fertil Steril. 58: 603-8.
18. Lucas, T.F.G., Royer, C., Siu, E.R., Lazari, M.F., Porto, C.S. (2010) Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat Sertoli cells. Biol Reprod. 83: 307-17.
19. Ma, Y.X., Ebine, N., Aoki, k., Kusunoki, M., Misumi, J. (2009) Effects of Cow's Milk on Reproduction in ICR Male Mice. Biomed Environ Sci. 22: 161-163.
20. Momeni, H.R., Daneshpajoh, F. (2012) Protective Effect of Vitamin E on Sperm Parameters in Adult Rat Treated with Para-nonylphenol. J Cell & Tissue (JCT). 2: 415-424.
21. Naslund, M.J., Colley, D.S. (1986) The differential effects of neonatal androgen, estrogen and progester one on adult rat prostate growth. J Urol. 136: 1136-1140.
22. Pape-Zambito, D.A., Roberts, R.F., Kensinger, R.S. (2010) Estrone and 17β-estradiol concentrations in pasteurized-homogenized milk and commercial dairy products. J Dairy Sci. 93: 2533-2540.
23. Parodi, P.W. (2012) Impact of cow's milk estrogen on cancer risk. Int Dairy J. 22: 3-14.
24. Qin, L.Q., Wang, P.Y., Kaneko, T., Hoshi, K., Sato, A. (2004) Estrogen: one of the risk factor in milk for prostate cancer. Med. Hypotheses. 62: 133-142.
25. Seegers, J.C., van Aswegen, C.H., Nieuwoudt, B.L., Joubert, W.S. (1991) Morphological effects of the catecholestrogens on cells of the seminiferous tubules of Sprague-Dawley rats. Andrologia. 23: 339-345.
26. Tabrizi, J.S., Fallah Rostami, F., Seyedi Dolatabad, Sh., Khojasteh Bojnordi, T., Ahmadi, S. (2014) Effect of Olea europaea Extract on Male Rats' Reproductive Parameters. CJMB. 1: 59-62.
27. Tsakmakidis, I.A., Lymberopoulos, A.G., Alexopoulos, C., Boscos, C.M., Kyriakis, S.C. (2006) In vitro effect of zearalenone and a-zearalenol in boar sperm characteristics and acrosome reaction. Reprod Dom Anim. 41: 394-401.

The effect of oral administration of pregnant cow's milk on male rat's spermatogenesis

Hamidiya, Z.[1], Tajik, P.[2], Zendehdel, M.[1*], Dezfoulian, O.[3], Sasani, F.[4]

[1]*Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[3]*Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khoramabad, Iran*
[4]*Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
(Received 17 August 2016, Accepted 8 November 2016)

Abstract:

BACKGROUND: Nowadays, infertility is one of the major problems of human societies. **OBJECTIVES:** To study oral administration of bulk milk and milk of late pregnant cows on spermatogenesis of male rats. **METHODS:** The first group of rats from day 1 of pregnancy until the end of lactation and then their male pups to maturity were treated with late pregnant cow's milk. The second group from day 12 of pregnancy up to 15 days after delivery was treated with late pregnant cow's milk. The third group of rats from day 1 of pregnancy until the end of lactation and then their male pups to maturity were treated with bulk milk. The fourth group from day 12 of pregnancy up to 15 days after delivery was treated with bulk milk. Rats in the control group during the study period were only fed with special food of rats and at the end viability, types of movement (progressive and in-place movement, immobility), number of sperms and also the serum testosterone level were elevated. **RESULTS:** Administration of both types of milk had no effect on in-place movement and also viability of sperms of experimental groups but they could cause a significant increase in sperm immobility and a significant decrease in number of sperms of experimental groups. Also,the level of serum testosterone of experimental groups was significantly reduced in comparison with control group ($p<0.05$). **CONCLUSIONS:** Overall, it was determined consumption of late pregnant cow's milk and bulk milk when it contains high estrogen can cause changes in some sperm species that are involved in male reproduction.

Keyword: milk, estrogen, spermatogenesis, infertility

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Rate of estrogen in late pregnant cow's milk and non pregnant cows and bulk milk.

Graph 1. Percentage of sperms progressive movement of experimental groups following administration of late pregnant cow's milk and bulk milk in comparison with control group ($p<0.05$).

Graph 2. Percentage of sperms in-place movement of experimental groups following administration of late pregnant cow's milk and bulk milk in comparison with control group ($p<0.05$). Dissimilar letters (a,b) indicate significant different between groups ($p<0.05$).

Graph 3. Percentage of sperms immobility movement of experimental groups following administration of late pregnant cow's milk and bulk milk in comparison with control group ($p<0.05$). Dissimilar letters (a,b) indicate significant different between groups ($p<0.05$).

Graph 4. Numbers of sperms of experimental groups following administration of late pregnant cow's milk and bulk milk in comparison with control group ($p<0.05$). Dissimilar letters (a,b) indicate significant different between groups ($p<0.05$).

Graph 5. Percentage of sperms viability of experimental following administration of late pregnant cow's milk and bulk milk in comparison with control group ($p<0.05$). Dissimilar letters (a,b) indicate significant different between groups ($p<0.05$).

Graph 6. Serum testosterone level of experimental groups following administration of late pregnant cow's milk and bulk milk in comparison with control group ($p<0.05$). Dissimilar letters (a,b) indicate significant different between groups ($p<0.05$).

***Corresponding author's email: zendedel@ut.ac.ir, Tel: 021-61117186, Fax: 021-66933222**