

Original Article

The effect of hydroalcoholic extract of Flax seed (*Linum Usitatissimum L.*) and vitamin C on the fertility indices of male rats exposed to lead acetate

Sahar Mosleh Ghahfarokhi¹ , Abdolrasoul Namjou^{1*} 

¹ Department of Veterinary, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

*Corresponding author: Abdolrasoul Namjou

Tel: +98 38 333361045

Fax: +983832221357

E-mail: ar.namjo72@gmail.com

ABSTRACT

Background and Aims: Lead acetate has cytotoxic effects on testicular tissue. These effects can cause infertility in laboratory animals and humans. The present study was conducted to investigate the effect of Flax seed extract and ascorbic acid on fertility indicators and histopathological changes of sperm and testes in male rats.

Materials and Methods: This experimental study was conducted on 30 Wistar rats. The rats were randomly divided into five groups (6 rats per group), including the control, lead acetate recipient, lead acetate and Flax seed hydroalcoholic extract recipient, lead acetate and vitamin C recipient, as well as lead acetate, Flax seed, and vitamin C recipient. Following that, 50 mg/kg lead, vitamin C (300 mg/kg), and Flax seed (300 mg/kg) were administered orally by gavage for 35 days. The blood samples extracted from the heart and testicular tissue were routinely obtained.

Results: Exposure to lead caused disruption in the morphological structure of spermatogenic tubules, including spermatogenic cell lines, compared to the control group. There was a significant difference in the percentage of head and tail violations in the treatment groups, compared to the control group. Moreover, sperm motility and progressive movement in the treatment groups showed a significant decrease, compared to the control group ($P < 0.01$). Lead acetate also increased oxidative stress and decreased serum antioxidant capacity in all groups, compared to the control group ($P < 0.01$).

Conclusion: It seems that the use of vitamin C and hydroalcoholic extract of *Linum Usitatissimum L.* was not effective in preventing histopathological changes in rats exposed to lead acetate.

Keywords: Flax seed, lead acetate, *Linum Usitatissimum L.*, Rat, Vitamin C



Citation: Mosleh Ghahfarokhi S, Namjou A. [The effect of hydroalcoholic extract of Flax seed (*Linum Usitatissimum L.*) and vitamin C on the fertility indices of male rats exposed to lead acetate]. Journal of Translational Medical Research. 2025; 32(1): 47-58. [Persian]

DOI  <http://doi.org/10.32592/JBirjandUnivMedSci.2025.32.?.?????>

Received: April 03, 2025

Accepted: May 03, 2025



Copyright © 2025, Journal of Translational Medical Research. This open-access article is available under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 (CC BY-NC 4.0) International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which allows for the copying and redistribution of the material only for noncommercial purposes, provided that the original work is properly cited.

تأثیر عصاره هیدروالکلی تخم کتان (*Linum Usitatissimum L.*) و اسید اسکوریک بر شاخص‌های باروری موش‌های صحرایی نر در مواجهه با استات سرب

سحر مصلح قهفرخی^۱، عبدالرسول نامجو^{۱*} 

چکیده

زمینه و هدف: استات سرب دارای اثرات سیتوتوکسیک بر بافت بیضه است که می‌تواند سبب ناباروری در حیوانات آزمایشگاهی و انسان شود. پژوهش حاضر با هدف تأثیر عصاره برزک و اسیداسکوریک بر شاخص‌های باروری و تغییرات هیستوپاتولوژی بیضه در موش‌های صحرایی نر انجام شد.

روش تحقیق: این مطالعه تجربی بر روی ۳۰ سر موش نر ویستار انجام گرفت. موش‌های صحرایی به‌طور تصادفی به ۵ گروه ۶ تایی به‌ترتیب شامل گروه کنترل، دریافت‌کننده استات سرب، دریافت‌کننده استات سرب و عصاره هیدروالکلی برزک، دریافت‌کننده استات سرب و ویتامین C و دریافت‌کننده استات سرب، برزک و ویتامین C تقسیم شدند. سرب به مقدار ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ویتامین C و برزک هرکدام به مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی به مدت ۳۵ روز به روش گاواژ داده شد. نمونه‌های خون از قلب و بافت بیضه به روش روتین اخذ شد.

یافته‌ها: مواجهه با استات سرب به‌هم ریختگی در ساختار مورفولوژیک لوله‌های اسپرم‌ساز از جمله رده‌های سلولی اسپرم‌ساز نسبت به گروه کنترل گردید. درصد نقص سر و دم در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف معناداری شد. همچنین تحرک اسپرم و حرکت پیش‌رونده در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل کاهش معنادار را نشان داد ($P < 0/01$). همچنین استات سرب باعث افزایش استرس اکسیداتیو و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدان سرم در تمام گروه‌ها نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0/01$). **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد استفاده از ویتامین C و عصاره هیدروالکلی برزک در پیشگیری از تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت بیضه موش‌های تحت مواجهه با استات سرب، مؤثر نبود.

واژه‌های کلیدی: تخم کتان، استات سرب، *Linum Usitatissimum L.*، موش صحرایی، ویتامین C

مجله "تحقیقات پزشکی ترجمانی"، ۱۴۰۴؛ ۳۲(۱): ۵۸-۴۷.

دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۱۴ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۱۳

^۱ گروه دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

*نویسنده مسئول: گروه دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

آدرس: شهرکرد- رحمتیه- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد- گروه دامپزشکی

تلفن: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۴۵ نمابر: ۰۳۸۳۲۲۲۱۳۵۷ پست الکترونیکی: ar.namjo72@gmail.com

مقدمه

مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که میانگین شیوع ناباروری در جهان ۱۰ درصد است. کمترین و بیشترین شیوع ناباروری به ترتیب در استرالیا و آفریقا گزارش شده است. شیوع ناباروری در ایالات متحده، ۱۰ تا ۱۵ درصد، در چین حدود ۹ درصد و در ایران ۱۳/۲ درصد است. مطالعات نشان می‌دهد که یک ششم زوجها از ناباروری رنج می‌برند و عوامل محیطی، شغلی و به‌ویژه ژنتیکی را در بروز آن دخیل می‌دانند (۱).

یکی از عوامل مهم مرتبط با ناباروری مردان، کمیت و کیفیت اسپرم تولید شده است (۲). شکست اسپرماتوژنز ناشی از عوامل متعددی از جمله بیماری‌های سیستمیک، اختلالات غدد درون‌ریز، سوءتغذیه، عوامل ژنتیکی و خطرات محیطی است (۳). همان‌طور که مطالعات اپیدمیولوژیک و مطالعات تجربی روی حیوانات آزمایشگاهی نشان داده است که، فلزات سنگین ممکن است تولیدمثل جنس نر را به خطر بیندازند (۴). مسمومیت با سرب باعث مهار عملکرد بیضه‌ها به همراه عملکرد غدد جنسی ثانویه مانند پروستات، اپیدیدیم و وزیکول سمینال می‌شود و در نتیجه ترکیب بیوشیمیایی آن‌ها تغییر می‌کند و هم بر اسپرماتوژنیز و گامتوژن تأثیر دارد (۵). تجمع سرب در بیضه دارای اثر ضداسپرمزایی است (۶). مواجهه با سرب موجب آسیب اکسیداتیو می‌شود که یکی از مکانیسم‌های احتمالی مسمومیت با سرب است که نشان می‌دهد آنتی‌اکسیدان‌ها ممکن است در درمان مسمومیت با سرب نقش داشته باشند (۷).

گیاهان دارویی حاوی فنل و فلاونوئیدها به دلیل نقش آنتی‌اکسیدانی خود، به‌طور مستقیم با وارد شدن در واکنش‌های احیایی، مانع تنش اکسیداتیو می‌شوند و مانند بسیاری دیگر از پلی‌فنل‌ها، جمع‌کننده رادیکال‌های آزاد هستند زیرا به‌عنوان گروه‌های قوی الکترون دهنده و پروتون دهنده عمل می‌کنند (۸). تخم کتان با نام علمی *Linum Usitatissimum L.* از گیاهان دارویی مهم است و از جمله خواص تخم کتان خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای آن است. تخم کتان مقادیر زیادی لیگنان دارد (۹، ۱۰). لیگنان‌ها نوعی فیبر پلی‌فنلی و یکی از گروه‌های اصلی

فیتواستروژن‌ها هستند و در مواد غذایی مانند میوه‌ها، سبزیجات و دانه‌های روغنی به‌ویژه دانه کتان یافت می‌شود. لیگنان‌ها گروهی از ترکیبات طبیعی فنلی هستند که اسکلت کربنی آن‌ها بر اساس اتصال واحدهای C3C6 بنا شده است و دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد ویروسی و ضد سرطانی هستند (۱۱). اسید اسکوربیک یا ویتامین C این ویتامین محلول در آب است و دارای چندین اثر غیر آنزیمی به واسطه فعالیت خود به‌عنوان یک عامل احیاء کننده و از بین برنده رادیکال‌های آزاد اکسیژن است. در ضمن موجب احیاء ویتامین E اکسید شده توسط مواد اکسید کننده نیز می‌گردد. اسید اسکوربیک در اکسیداسیون و احیاء طی تنفس سلولی و فرآیندهای متابولیکی مختلف و مقاومت در برابر عفونت و برای پیشرفت روند تکوین سلول‌های جنسی لازم و ضروری است (۱۲)، اسید اسکوربیک در ممانعت از آثار تخریبی استرس اکسیداتیو بر سلول نقش دارد (۱۳، ۱۴). تحقیق حاضر که به منظور ارزیابی بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی تخم کتان (برزک) بر تغییرات هیستوپاتولوژیک بیضه و شاخص‌های باروری اسپرم موش‌های صحرایی نر در معرض سرب به روش تجربی انجام شد، در راستای سلسله تلاش‌هایی است که در جهت یافتن روش‌های درمانی گیاهی در داخل کشور صورت می‌گیرد.

روش تحقیق

نوع مطالعه و نمونه‌گیری

۳۰ سر موش صحرایی نر آلبینو نژاد ویستار با دامنه سنی ۱۲ تا ۱۵ هفته و وزن تقریبی 20 ± 200 گرم از انستیتو پاستور تهران تهیه و در مرکز تحقیقات آسیب‌شناسی بیمارستان دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد در شرایط آزمایشگاهی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و دمای 2 ± 24 سانتی‌گراد با دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد و بر اساس دستورالعمل‌های کمیته حمایت از حیوانات آزمایشگاهی با کد اخلاق IR.IAU.SHK.REC.1402.046 نگهداری شدند. موش‌های صحرایی پس از یک هفته در شرایط آزمایشگاهی و تطابق با این شرایط در ۵ گروه ۶ تایی به شرح ذیل تقسیم شدند.

گروه کنترل: دریافت کننده آب مقطر (۱۰ میلی لیتر بر کیلوگرم) به صورت خوراکی به مدت ۳۵ روز

گروه دوم: گروه تحت درمان با استات سرب (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت خوراکی به مدت ۳۵ روز

گروه سوم: گروه تحت درمان با استات سرب (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت خوراکی و سه ساعت بعد عصاره هیدروالکلی برزک (۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به مدت ۳۵ روز.

گروه چهارم: گروه تحت درمان با استات سرب (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت خوراکی و سه ساعت بعد اسید آسکوربیک (۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به مدت ۳۵ روز.

گروه پنجم: گروه تحت درمان با استات سرب (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت خوراکی و سه ساعت بعد اسید آسکوربیک (۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و عصاره هیدروالکلی برزک (۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به مدت ۳۵ روز (۳).

موش های صحرایی نر بعد از ۱۲ ساعت از پایان تزریق و گاواژ دارو از دسترسی به غذا دور نگهداشته شدند و توسط ترازوی دیجیتال بویکو مدل BWL 51 ساخت کشور آلمان با دقت ۰/۰۱ گرم توزین شدند. در پایان دوره مطالعه موش های صحرایی با اثر بی هوش، به روش معمول محوطه شکمی باز، بافت بیضه به همراه اپیدیدیم سمت راست خارج و اسپرم به محیط اختصاصی کشت هام جهت بررسی مورفولوژیک و شمارش اسپرم های زنده انتقال یافت. سپس خون گیری از قلب (cardiac puncture) تحت بی هوشی به منظور انجام آزمایش های اندازه گیری مالون دی آلدئید و ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم، بعد از خون گیری به وسیله سرنگ بدون ماده ضد انعقاد، نمونه خونی اخذ شده به وسیله دستگاه سانتریفیوژ هیتچ مدل EBA 200 ساخت کشور آلمان به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید و سرم به دست آمده از نمونه خون جدا شد و تا زمان انجام آزمایش های سرمی در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

تهیه گیاه و عصاره گیری

در این مطالعه آزمایشگاهی، بذر گیاه کتان پس از خرید از

مراکز تولید بذر توسط کارشناس مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تأیید و به شماره هرباریوم ۱۰۵۱ ثبت گردید. سپس تخم گیاه کتان پودر شده و از الک عبور داده شد و در ظرف شیشه ای و در جای خنک به منظور عصاره گیری و انجام آزمایش های مربوطه مورد استفاده قرار گرفت. عصاره بذر کتان به روش ماسیراسیون با استفاده از حلال اتانول در دو نوبت تهیه شد. ابتدا ۵۰۰ گرم از پودر بذر گیاه الک شده با ترازوی دیجیتال توزین شد. پودر توزین شده را درون بشر ریخته و اتانول ۸۰ درصد به آن اضافه شد تا سطح پودر را به طور کامل بپوشاند. مخلوط حاصل به مدت ۴۰ ساعت بر روی شیکر با شدت ۱۰۰ دور در دقیقه در شرایط تاریکی و دمای اتاق قرار داده شد. مخلوط اتانولی با استفاده از قیف بوخنر و کاغذ واتمن شماره ۴۲ صاف شده و به منظور حذف حلال و تغلیظ عصاره اتانولی از دستگاه تقطیر در خلاء چرخان با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد استفاده شد. عصاره به دست آمده در داخل آون قرار گرفت تا به طور کامل خشک گردد. عصاره خشک شده، توزین و در پلیت شیشه ای سربسته ریخته و با فویل آلومینیوم پوشانده شد و تا زمان انجام مراحل بعدی تحت شرایط مناسب نگهداری گردید.

مراحل انجام کار برای شمارش اسپرم

- ۱- قرار دادن میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری حاوی ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت Human Tubal Fluid (HTF) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد
- ۲- جدا کردن ناحیه دم اپیدیدیم از بیضه و قراردادن آن در میکرو تیوب حاوی HTF گرم و برش زدن آن با قیچی به منظور آزاد شدن اسپرم از آن، افزودن ۵۰۰ میکرولیتر HTF به میکرو تیوب و سپس انکوبه کردن آن به مدت ۱۰ دقیقه
- ۳- مخلوط کردن نمونه و سپس برداشت ۵ میکرولیتر از آن به ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر به منظور شمارش اسپرم
- ۴- قراردادن ۵ میکرولیتر از نمونه بر روی لام مخصوص آنالیز اسپرم به منظور بررسی تحرک اسپرم
- ۵- بررسی تحرک اسپرم
- ۶- قراردادن ۱۵ میکرولیتر از رنگ اتوزین نیگروزین بر روی

لام، افزودن ۱۵ میکرولیتر نمونه اسپرم به آن، مخلوط کردن رنگ و نمونه اسپرم، تهیه اسمیر ۳۰ ثانیه پس از افزودن نمونه اسپرم، سپس خشک شدن نمونه و بررسی مورفولوژی و تعیین درصد اسپرم‌های زنده و مرده در زیر میکروسکوپ با لنزهای ۴۰ و ۱۰۰ (بزرگنمایی ۴۰۰ و ۱۰۰۰ برابر)

۷- شمارش اسپرم با استفاده از لام نئوبار

آماده نمودن بافت بیضه برای مطالعات میکروسکوپ

بافت بیضه سمت چپ در داخل فرمالین بافر ۱۰ درصد انتقال و پس از مراحل آب‌گیری، شفاف‌سازی و آغشتگی با پارافین، برش‌های به ضخامت ۵ میکرون از بلوک‌های پارافینی تهیه و به روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شد.

اندازه‌گیری غلظت مالون دی آلدئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم

میزان مالون دی آلدئید (MDA) سرم با استفاده از روش کالریمتری واکنش اسید تیوباریتوریک با مالون دی آلدئید که ایجاد ترکیب رنگی با جذب نوری در ۵۳۲ نانومتر می‌کند، اندازه‌گیری شد (۱۵). ظرفیت آنتی‌اکسیدان سرم نیز با استفاده از ترکیب تری پیریدیل تری آذین TPTZ و با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۹۳ نانومتر تعیین شد (۱۶).

آنالیزهای آماری

نتایج به‌دست آمده به وسیله برنامه SPSS24 و با استفاده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون مقایسه‌ای تعقیبی توکی استفاده شد و تغییرات هیستوپاتولوژیک بر اساس روش توصیفی گزارش گردید، نمودارها با استفاده از نرم‌افزار گراف پد پریم ترسیم شد.

یافته‌ها

تحرك اسپرم

نتایج تحرک اسپرم بین گروه کنترل با سایر گروه‌ها، افزایش

آماري معنادار را نشان داد ($P=0/002$). اما بین گروه تحت مواجهه با سرب با گروه‌های تحت مواجهه با سرب با برزک ($P=0/67$)، سرب با ویتامین C ($P=0/47$) و سرب با برزک و ویتامین C ($P=0/37$) اختلاف آماری معنادار نداشت (شکل ۱).

حرکت پیش‌رونده

نتایج میانگین حرکت پیش‌رونده اسپرم بین گروه کنترل با سایر گروه‌های تیمار شامل: گروه تحت مواجهه با سرب ($P=0/007$)، سرب و برزک ($P=0/02$)، سرب و ویتامین C ($P=0/006$) افزایش آماری معنادار را نشان داد. اما بین گروه تحت مواجهه با سرب با گروه‌های تحت مواجهه با سرب با برزک ($P=0/67$)، سرب با ویتامین C ($P=0/47$) و سرب با برزک و ویتامین C ($P=0/955$) اختلاف آماری معنادار مشاهده نشد (شکل ۱).

درصد زنده ماندن اسپرم

نتایج درصد زنده ماندن اسپرم بین گروه کنترل و سایر گروه‌های تحت مطالعه اختلاف آماری معنادار را نشان نداد ($P=0/136$) (شکل ۱).

درصد نقص سر

نتایج درصد نقص سر اسپرم بین گروه کنترل و سایر گروه‌های تحت مطالعه اختلاف آماری معنادار را نشان داد ($P=0/01$) (شکل ۱).

درصد نقص سر اسپرم در گروه تحت درمان با سرب نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار را نشان داد ($P=0/05$)، در گروه تحت مواجهه با سرب و تحت درمان با برزک و ویتامین C نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار داشت ($P=0/033$). در گروه تحت مواجهه با سرب و تحت درمان با برزک نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار را نشان داد ($P=0/027$). در گروه تحت مواجهه با سرب و تحت درمان با ویتامین C نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار را نشان داد ($P=0/008$) (شکل ۱).

درصد نقص دم

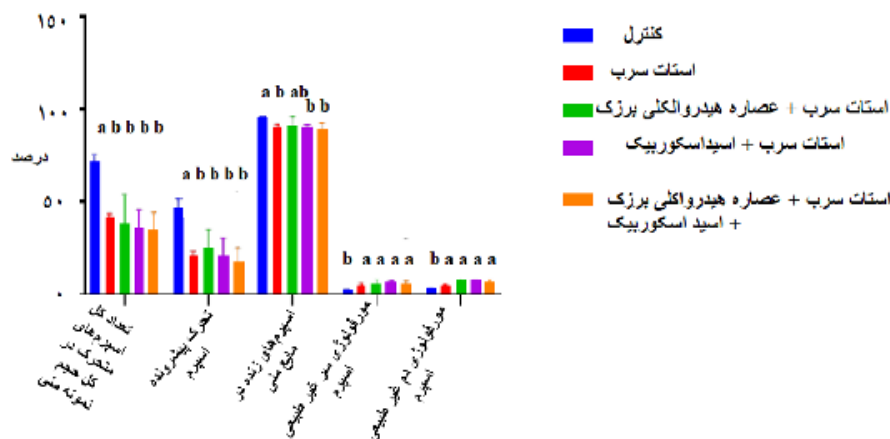
نتایج درصد نقص دم اسپرم بین گروه‌های تحت مطالعه اختلاف آماری معنادار را نشان داد ($P=0/009$) (شکل ۱). درصد نقص دم در گروه تحت مواجهه با سرب و درمان با عصاره برزک و ویتامین C نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار را نشان داد ($P=0/016$). همچنین درصد نقص دم اسپرم در گروه تحت مواجهه با سرب و درمان با برزک نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار را نشان داد ($P=0/016$). درصد نقص دم اسپرم در گروه تحت مواجهه با سرب و درمان با ویتامین C در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنادار را نشان داد ($P=0/023$) (شکل ۱).

شمارش اسپرم

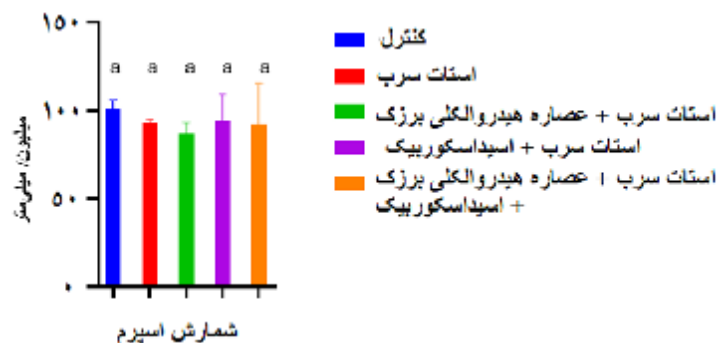
نتایج شمارش اسپرم بین گروه کنترل و سایر گروه‌های تحت مطالعه اختلاف آماری معنادار را نشان نداد ($P=0/818$) (شکل ۲).

یافته‌های آزمون استرس اکسیداتیو

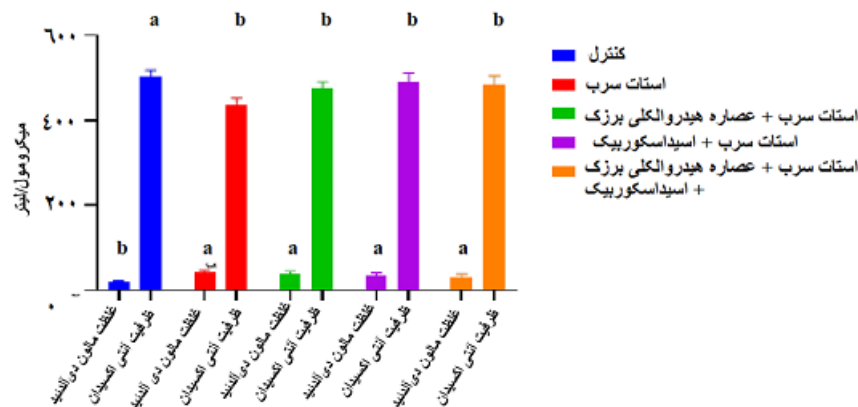
میزان MDA سرم موش‌های صحرایی گروه کنترل نسبت به سایر گروه‌ها کاهش معنادار داشت ($P<0/01$). مقدار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلازما (FRAP) در سرم گروه کنترل نسبت به سایر گروه‌های تحت مطالعه افزایش معنادار را نشان داد ($P<0/01$) (شکل ۳).



شکل ۱- درصد کلی اسپرم‌های متحرک، حرکت فعال و مستقیم اسپرم، درصد اسپرم‌های زنده، درصد اسپرم با مورفولوژی سر غیرطبیعی و درصد اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی دم در موش صحرایی نر تحت مواجهه با سرب، ویتامین C و عصاره هیدروالکلی برزک. (حروف غیرمشابه a, b در بالای هر ستون نشان دهنده اختلاف معنادار ($P<0/01$)).



شکل ۲- تعداد اسپرم (میلیون/میلی‌لیتر) در موش‌های صحرایی نر تحت مواجهه با سرب، ویتامین C و عصاره هیدروالکلی برزک. (حروف مشابه a در بالای هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنادار ($P>0/01$)).



شکل ۳- سطح مالون دی آلدئید و ظرفیت آنتی اکسیدانی در موش‌های صحرایی نر تحت مواجهه با سرب، ویتامین C و عصاره هیدروالکلی برزک. (حروف غیرمشابه a و b در بالای هر ستون نشان دهنده اختلاف معنادار است ($P < 0.05$)).

نتایج هیستوپاتولوژی بیضه

ارزیابی هیستوپاتولوژی بیضه موش‌های صحرایی گروه کنترل

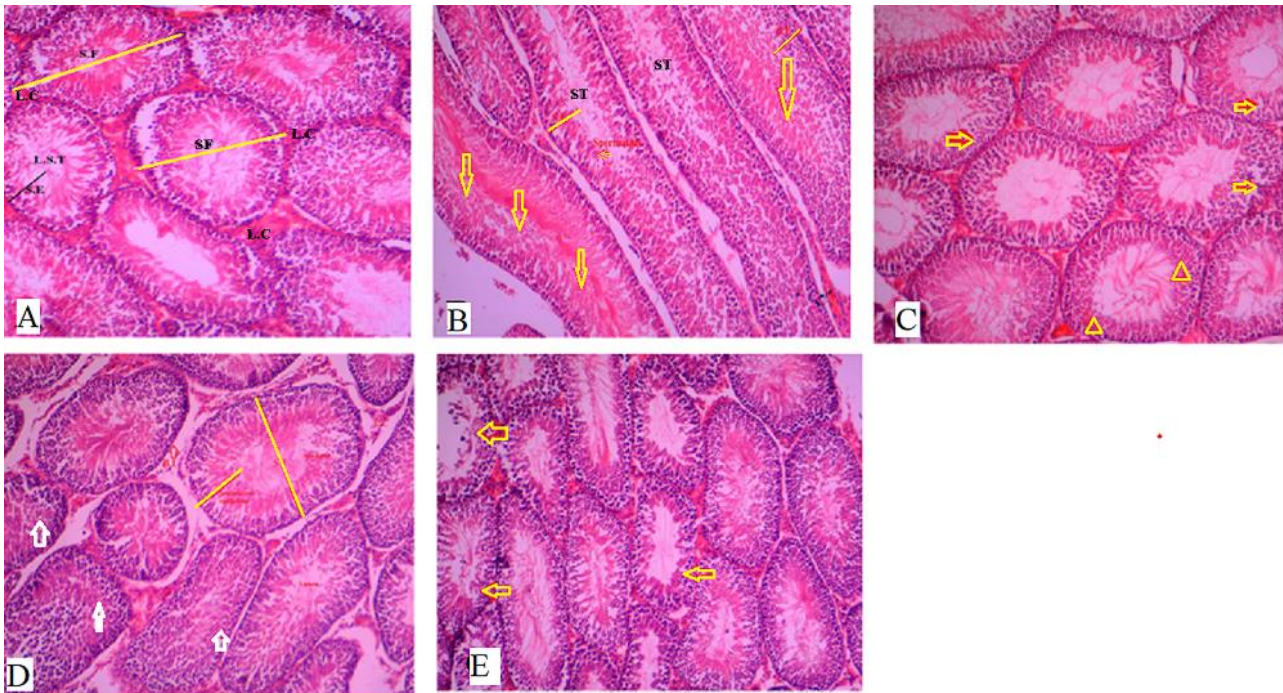
در گروه کنترل ساختار بافت‌شناسی بیضه و لوله‌های اسپرماتوزن به صورت طبیعی مشاهده گردید؛ همچنین بین لوله‌های اسپرم‌ساز سلول‌های لایدیگ با ساختار طبیعی مشاهده شد. به صورتی که سلول‌های اسپرماتوگونی به صورت هسته پررنگ و هیپرکروماتین و سیتوپلاسم اندک بر روی غشاء پایه قرار گرفته و در بین سلول‌های اسپرماتوگونی سلول سرتولی واقع شده و بر روی سلول‌های اسپرماتوگونی سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه که بزرگترین سلول‌های منی‌ساز بود با کروماتین مشخص و هاله‌ای از سیتوپلاسم صورتی رنگ مشاهده گردید، همچنین به سمت مرکز اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتوزوئید به صورت طبیعی رؤیت شد و در قسمت مرکز اسپرماتوزوا مشاهده شد (شکل A).

ارزیابی هیستوپاتولوژی بیضه موش‌های صحرایی تحت مواجهه با استات سرب

در بافت بیضه موش‌های صحرایی تحت مواجهه با استات

سرب در لومن لوله‌های اسپرم‌ساز کاهش بلوغ و فقدان اسپرماتوزا مشاهده شد. همچنین سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتیدها دچار نکروز و تغییرات دژنراتیو شده بودند. همچنین در بین لوله‌های اسپرم‌ساز سلول‌های بنیادی (سلول‌های لایدیگ) کاهش را نشان دادند (شکل B، C) آتروفی و دژنراسیون سلول‌های اسپرم‌ساز مشاهده گردید. در برخی نواحی کاهش شدید سلول‌های اسپرماتوگونی مشاهده شد؛ همچنین سلول‌های ژنوم از بخش غشاء پایه جدا شده و به داخل لومن ریخته و در بخشی از توبول، از بین رفتن کامل غشاء سلولی مشاهده گردید.

فشرده شدن هسته‌ها همراه با سیتوپلاسم ائوزونوفیلی و کاهش تراکم سلول‌های اپی‌تلیوم اسپرم‌ساز در بافت بیضه موش‌های تحت مواجهه با سرب مشاهده شد (شکل C). موش‌های صحرایی تحت مواجهه با سرب و ویتامین C واکوئل‌های روشن پراکنده در بین سلول‌های اسپرماتوگونی لوله‌های اسپرم‌ساز مشاهده شد؛ اما ساختار لوله‌های اسپرم‌ساز تا حدودی طبیعی بود، همچنین در بیشتر توبول‌ها سلول‌های اسپرماتوزا دچار تغییرات، دژنراسیون و نکروز شده بود و کاهش تعداد اسپرماتیدها مشاهده گردید (شکل E، F).



تصویر یک- تصویر میکروسکوپی بافت بیضه موش صحرایی، لوله‌های اسپرم ساز. گروه کنترل. شکل A - بافت بیضه، لوله‌های اسپرم ساز موش صحرایی گروه کنترل. لوله‌های اسپرم ساز (S.F)، اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز، لومن لوله‌های اسپرم ساز (L.S.T) و سلول‌های بین لوله‌های اسپرم ساز (سلول‌های لایدیگ: L.C). (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین $\times 100$). B- بافت بیضه، لوله‌های اسپرم ساز موش صحرایی گروه تحت مواجهه با استات سرب (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، پیکان قرمز روند نکروز اپی‌تلیوم اسپرم‌ساز، دژنراسیون واکوتلار (رنگ آمیزی هماتوکسیلین $\times 100$). C. بافت بیضه، لوله‌های اسپرم‌ساز موش صحرایی گروه تحت مواجهه با استات سرب (۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم) و تحت درمان با برزک (۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، تغییرات دژنراتیو و نکروز در اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز (سرپیکان قرمز) و واکوتل‌های متعدد در میان لوله‌های اسپرم‌ساز (پیکان قرمز) (رنگ آمیزی هماتوکسیلین $\times 100$). D. بافت بیضه، لوله‌های اسپرم‌ساز موش صحرایی تحت مواجهه با استات سرب با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم و تحت درمان با اسید اسکوربیک با دوز ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم. تغییرات نکروز اسپرماتوسیت اولیه و سلول‌های اسپرماتید (پیکان سفید). (رنگ آمیزی هماتوکسیلین $\times 100$). E. بافت بیضه، لوله‌های اسپرم ساز موش صحرایی گروه تحت مواجهه با استات سرب (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و تحت درمان با برزک و ویتامین C (۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، تغییرات دژنراتیو و نکروز سلول‌های اسپرماتید (پیکان زرد). (رنگ آمیزی هماتوکسیلین $\times 100$).

ارزیابی هیستوپاتولوژی بیضه موش‌های صحرایی تحت مواجهه با برزک + سرب

تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت بیضه در گروه تحت مواجهه با استات سرب و تحت درمان با برزک نشان داد، اگرچه ساختار توبول‌های اسپرم‌ساز طبیعی است اما کاهش سلول‌های اسپرماتید و اسپرماتوزا چشمگیر است. همچنین سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید در اکثر توبول‌ها دچار تغییرات نکروز و دژنراسیون شده بودند و واکوتل‌های پراکنده در میان توبول‌های اسپرم‌ساز بین سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتید اولیه مشاهده شد. همچنین آتروفی و کاهش تعداد سلول‌ها لایدیگ (سلول‌ها بین لوله‌های اسپرم‌ساز) مشاهده گردید (شکل D).

ارزیابی هیستوپاتولوژی بافت بیضه موش‌های صحرایی تحت مواجهه با برزک + ویتامین C + سرب

در بافت بیضه موش‌های صحرایی تحت مواجهه با استات سرب، برزک و ویتامین C، کاهش تراکم سلول‌های اسپرم‌ساز قابل مشاهده بود. همچنین جدا شدن سلول‌های اسپرماتوگونی از غشاء پایه، نکروز اسپرماتیدها و اسپرماتوزا را نشان داد. در برخی توبول‌ها، اسپرماتوزا مشاهده نشد. همچنین واکوتل‌های پراکنده در میان اپی‌تلیوم سلول‌های اسپرم‌ساز مشاهده شد (شکل G). مقدار کمی سلول‌های لایدیگ در بین توبول‌های اسپرم‌ساز محیطی مشاهده و سلول‌های اسپرماتید که از نظر اندازه از اسپرماتوگونی‌ها کوچک‌تر بودند، تغییرات دژنراتیو و نکروز را نشان دادند.

بحث

در مطالعه حاضر استفاده از استات سرب با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی به مدت ۳۶ روز موجب تغییرات هیستوپاتولوژی شامل روند نکروز اپی تلیوم اسپرم ساز، دژنراسیون واکوئولار (شکل B,C)، کاهش تراکم سلول های اپی تلیوم اسپرم ساز و اسپرماتید (شکل C) و کاهش حرکات پیش رونده، افزایش درصد نواقص سر و دم در مقایسه با گروه کنترل شد. نتایج ارزیابی مطالعات بافت بیضه تحت تأثیر استات سرب در مطالعه حاضر، همسو با تحقیقات و مطالعات اخیر که به منظور بررسی اثرات سرب بر روی پارامترهای اسپرم و تغییرات هیستوپاتولوژی بیضه انجام شد (۳، ۵). مطالعات بسیاری نشان داده است که مسمومیت باروری از ویژگی های بارز مسمومیت با استات سرب محسوب می شود. به طوری که مسمومیت با سرب موجب تخریب اسپرماتوژنز و آپوپتوز اپی تلیوم زایای بیضه می شود (۱۷-۱۹). Wurlina و همکاران نشان دادند که اثرات شدید سرب بر روی عملکرد سیستم تناسلی نر از طریق تغییرات در اسپرماتوژنز و عملکرد اسپرم ایجاد می شود (۲۰).

نتایج مطالعه تجربی Wurlina و همکاران نشان داد که مواجهه موش های صحرایی نر با استات سرب با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۲۰ روز متوالی در گروه کنترل مثبت منجر به کاهش معنی دار در سطح سوپراکسید دیسموتاز، یکپارچگی غشای پلاسما، کاهش تعداد سلول های لیدیک و سرتولی، تعداد اسپرم، تحرک اسپرم و اسپرم های زنده و همچنین افزایش معنی دار ($P < 0.05$) در سطح مالون دی آلدئید و اسپرم های آپوپتوز و نکروزه در مقایسه با گروه کنترل منفی می شود، اما مصرف مورینگا اولیفیرا (گز روغنی) با دوز ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به موش های در معرض استات سرب تغییری در تعداد اسپرم، زنده مانی، آپوپتوز و نکروز در مقایسه با گروه کنترل منفی نداشت (۲۰). در مطالعه حاضر استفاده از استات سرب با گاوآژ اگرچه موجب افزایش نواقص سر و دم و کاهش حرکات پیش رونده شد اما تأثیر معناداری بر روی تعداد اسپرم نداشت که با مطالعات Wurlina همسو نبود. دلیل معنی دار نبودن کاهش تعداد اسپرم در مطالعه حاضر را می توان چرخه اسپرماتوژنز ۵۲ روزه در موش صحرایی (۲۱)، متصور شد که مواجهه خوراکی با استات سرب به مدت ۵ هفته متوالی تنها موجب

اختلال در برخی از پارامترهای باروری اسپرم می شود.

استرس اکسیداتیو یکی از مهم ترین مکانیسم های مطرح شده در مورد آسیب های بافتی ناشی از استات سرب است (۲۲) که با ایجاد اکسیداسیون چربی ها، و افزایش گونه های فعال اکسیژن^۱ موجب تغییر در یکپارچگی و سیالیت ساختار غشاء سلولی می گردد (۵). چندین دهه است که گونه های فعال اکسیژن به عنوان عامل مخرب و آسیب رسان به سلول ها و بافت ها شناخته شده است. اسپرم نخستین سلولی است که تولید گونه های فعال اکسیژن در آن اثبات شده است (۲۳).

Abu-Khudir و همکاران نشان دادند که مواجهه خوراکی موش های صحرایی با استات سرب با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به مدت ۳۰ روز باعث افزایش مالون دی آلدئید^۲، کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی، کاهش تعداد اسپرم، کاهش حرکت، کاهش زنده ماندن اسپرم و افزایش نواقص سر و دم و تغییرات هیستوپاتولوژیک در اسپرماتوژنز بیضه موش های تحت تأثیر استات سرب در مقایسه با گروه کنترل می شود (۲۴). همچنین مواجهه با استات سرب به طور قابل توجهی باعث کاهش پارامترهای آنتی اکسیدانی مانند گلوکوتایون پراکسیداز^۳، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوکوتایون S-ترانسفراز و کاهش محتوای گلوکوتایون در سلول های کبدی و گلبول های قرمز می شود، علاوه بر این، استات سرب به طور قابل توجهی پارامترهای اکسیداتیو از جمله غلظت مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن و همچنین بیان سیکلواکسیژناز-۲ (COX-2) را افزایش می دهد (۲۵). حال می توان بر اساس مطالعات قبلی نتیجه گرفت، استرس اکسیداتیو (مواجهه با استات سرب) و افزایش مالون دی آلدئید یکی از دلایل اصلی ایجاد تغییرات هیستوپاتولوژیک در بافت بیضه و تغییرات در ناحیه سر و دم و کاهش حرکات پیش رونده است و افزایش تولید بیش از حد گونه های فعال اکسیژن و کاهش توانایی آنتی اکسیدان در مایع منی و بافت بیضه، باعث ایجاد این تغییرات می شود که با مطالعات حاضر مطابقت دارد. در مطالعه حاضر استفاده از اسیداسکوربیک و عصاره هیدروالکلی بزرک موجب افزایش حرکات پیش رونده و کاهش نواقص سر و دم در موش های

¹ Reactive oxygen species (ROS)

² Malondialdehyde (MDA)

³ Glutathione peroxidases (GPXs)

تحت مواجهه با سرب در مقایسه با گروه کنترل نشد که نشان از افزایش استرس اکسیداتیو در بافت بیضه متعاقب مواجهه خوراکی با استات سرب است.

بذر کتان روغنی علاوه بر داشتن امگا-۳، دارای ویتامین E نیز است. گیاه کتان حاوی مقادیر بالایی ترکیبات لیگنانی مانند پودوفیلوتوکسین در اندام‌های مختلف خود است (۲۶). بذر کتان یکی از منابع گیاهی غنی از آن-۳ اسیدهای چرب، لینولینیک اسید و منبع غنی از Secoisolariciresinol diglucoside (SDG) که پیش‌ساز لیگنان است و توسط فلور باکتریایی روده در کولون به دولیگنان انترودیول و انترولاکتون تبدیل می‌شود (۲۷). همچنین افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی روغن برزک، ممکن است با افزایش اسید آکونیتیک از طریق بیان ژن‌های ABAT و AHDHA مرتبط با مسیر متابولیسم اسید پروپیونیک، موجب بهبود کیفیت اسپرم شود (۲۸). اما در مطالعه حاضر تأثیر مفیدی بر روی شاخص‌های مورفولوژیک اسپرم و ممانعت از مسمومیت‌زایی استات سرب بر روی بافت بیضه مشاهده نشد.

ویتامین C (اسید آسکوربیک) آنتی‌اکسیدانی با وزن مولکولی پایین است که گونه‌های فعال اکسیژن مایع را از طریق انتقال خیلی سریع الکترون هضم کرده و از پراکسیداسیون چربی جلوگیری می‌کند (۲۹). در مطالعه حاضر، استفاده از ویتامین C، عصاره هیدروالکلی و برزک، موجب افزایش حرکات پیش‌رونده و کاهش نواقص سر و دم در موش‌های تحت مواجهه با استات سرب در مقایسه با گروه کنترل مثبت نشد. به‌هرحال مصرف استات سرب با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و استات سرب با اسید آسکوربیک، برزک و اسید آسکوربیک همراه با عصاره هیدروالکلی برزک باعث کاهش حرکات پیش‌رونده در اسپرم، نواقص دم و نواقص سر گردید و هیچ تأثیری بر روی کاهش نواقص سر، نواقص دم و حرکت پیش‌رونده نداشت.

احمدی و همکاران در یک بررسی مبتنی بر شواهد با هدف بررسی اثرات مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی خوراکی بر بهبود پارامترهای اصلی مایع منی مانند غلظت اسپرم، تحرک، مورفولوژی، آسیب DNA و میزان باروری در مردان نشان دادند که مکمل‌هایی مانند CoQ10 و آلفا توکوفرول به‌طور قابل توجهی تعداد اسپرم را بهبود

می‌بخشد. همچنین، کارنتین اثرات مثبتی بر تحرک و مورفولوژی اسپرم دارد و تجویز همزمان ویتامین E و ویتامین C آسیب DNA اسپرم را کاهش می‌دهد، با این حال، در برخی مطالعات، یک یا چند عامل به طور قابل توجهی تغییر نکرده بودند (۳۰) که ممکن است توجیهی بر یافته‌های مطالعه حاضر باشد.

نتیجه‌گیری

استفاده از ویتامین C و عصاره هیدروالکلی برزک در پیشگیری از تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت بیضه موش‌های صحرایی تحت مواجهه با استات سرب با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۳۵ روز مؤثر نبود که ممکن است به علت دوز بالای استات سرب، طول دوره درمان و بدنال آن اثر آنتی‌اکسیدانی اسیدآسکوربیک و تخم کتان خنثی شده باشد. این مطالعه گامی مهم در درک محدودیت‌های درمان‌های آنتی‌اکسیدانی رایج در مواجهه با سمیت فلزات سنگین در دوزهای بالا است.

تقدیر و تشکر

این مقاله اقتباس از پایان‌نامه خانم سحر مصلح قهفرخی تحت عنوان "بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی تخم کتان (برزک) *Linum Usitatissimum L.*) بر تغییرات هیستوپاتولوژیک بیضه و شاخص‌های باروری موش‌های صحرایی نر در معرض سرب"، در مقطع دکترای حرفه‌ای دامپزشکی در سال ۱۴۰۲ با کد پروپوزال ۱۶۲۷۲۶۲۴۱ است.

از پژوهشکده فن‌آوری تولیدمثل دانشگاه شهرکرد و آقای دکتر ابراهیم احمدی تشکر و قدردانی می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر پس از تأیید شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و کمیته اخلاق با کد IR.IAU.SHK.REC.1402.046 انجام شد.

حمایت مالی

این تحقیق هیچ‌گونه کمک مالی از دانشگاه یا سازمان‌های

تأمین مالی در بخش خصوصی یا تحقیقاتی را دریافت نکرد.

و تحلیل داده‌ها، نوشتن مقاله و ویرایش نهایی مقاله.

مشارکت نویسندگان

رها مصلح: تأمین مالی پروژه تحقیقاتی.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافی در

پژوهش حاضر وجود ندارد.

عبدالرسول نامجو: انجام کارهای عملی، استخراج داده‌ها، تجزیه

منابع

1. Manouchehri A, Shokri S, Pirhadi M, Karimi M, Abbaszadeh S, Mirzaei G, et al. The Effects of Toxic Heavy Metals Lead, Cadmium and Copper on the Epidemiology of Male and Female Infertility. *JBRA Assist Reprod*. 2022; 26(4): 627-630. DOI: [10.5935/1518-0557.20220013](https://doi.org/10.5935/1518-0557.20220013).
2. Babakhanzadeh E, Nazari M, Ghasemifar S, Khodadadian A. Some of the Factors Involved in Male Infertility: A Prospective Review. *Int J Gen Med*. 2020; 13: 29-41. DOI: [10.2147/IJGM.S241099](https://doi.org/10.2147/IJGM.S241099).
3. Offor SJ, Mbagwu HO, Orisakwe OE. Improvement of Lead Acetate-Induced Testicular Injury and Sperm Quality Deterioration by Solanum Anomalum Thonn. Ex. Schumach Fruit Extracts in Albino Rats. *J Family Reprod Health*. 2019; 13(2): 98-108. PMID: [31988646](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31988646/); PMCID: [PMC6969887](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6969887/).
4. Omolaoye TS, Skosana BT, Ferguson LM, Ramsunder Y, Ayad BM, Du Plessis SS. Implications of Exposure to Air Pollution on Male Reproduction: The Role of Oxidative Stress. *Antioxidants*. 2024; 13(1):64. DOI: [10.3390/antiox13010064](https://doi.org/10.3390/antiox13010064)
5. Elgawish RAR, Abdelrazek HMA. Effects of lead acetate on testicular function and caspase-3 expression with respect to the protective effect of cinnamon in albino rats. *Toxicol Rep*. 2014; 1: 795-801. DOI: [10.1016/j.toxrep.2014](https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014).
6. Alotaibi MF, Al-Joufi F, Abou Seif HS, Alzoghbi MA, Djouhri L, Ahmeda AF, Mahmoud AM. Umbelliferone Inhibits Spermatogenic Defects and Testicular Injury in Lead-Intoxicated Rats by Suppressing Oxidative Stress and Inflammation, and Improving Nrf2/HO-1 Signaling. *Drug Des Devel Ther*. 2020; 14: 4003-4019. DOI: [10.2147/DDDT.S265636](https://doi.org/10.2147/DDDT.S265636).
7. Wahyuningsih SPA, Savira NII, Anggraini DW, Winarni D, Suhargo L, Kusuma BWA, et al. Antioxidant and Nephroprotective Effects of Okra Pods Extract (*Abelmoschus esculentus* L.) against Lead Acetate-Induced Toxicity in Mice. *Scientifica (Cairo)*. 2020; 4237205. DOI: [10.1155/2020/4237205](https://doi.org/10.1155/2020/4237205).
8. Costa M, Sezgin-Bayindir Z, Losada-Barreiro S, Paiva-Martins F, Saso L, Bravo-Díaz C. Polyphenols as Antioxidants for Extending Food Shelf-Life and in the Prevention of Health Diseases: Encapsulation and Interfacial Phenomena. *Biomedicines*. 2021; 9(12):1909. DOI: [10.3390/biomedicines9121909](https://doi.org/10.3390/biomedicines9121909).
- 9- Mueed A, Shibli S, Korma SA, Madjirebaye P, Esatbeyoglu T, Deng Z. Flaxseed Bioactive Compounds: Chemical Composition, Functional Properties, Food Applications and Health Benefits-Related Gut Microbes. *Foods*. 2022; 11(20): 3307. DOI: [10.3390/foods11203307](https://doi.org/10.3390/foods11203307).
- 10- Goyal A, Sharma V, Upadhyay N, Gill S, Sihag M. Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *J Food Sci Technol*. 2014; 51(9): 1633-53. DOI: [10.1007/s13197-013-1247-9](https://doi.org/10.1007/s13197-013-1247-9).
- 11- Rodríguez-García C, Sánchez-Quesada C, Toledo E, Delgado-Rodríguez M, Gaforio JJ. Naturally Lignan-Rich Foods: A Dietary Tool for Health Promotion? *Molecules*. 2019; 24(5): 917. DOI: [10.3390/molecules24050917](https://doi.org/10.3390/molecules24050917)
- 12-. Giannakourou MC, Taoukis PS. Effect of Alternative Preservation Steps and Storage on Vitamin C Stability in Fruit and Vegetable Products: Critical Review and Kinetic Modelling Approaches. *Foods*. 2021; 10(11): 2630. DOI: [10.3390/foods10112630](https://doi.org/10.3390/foods10112630).
13. Bunpo P, Anthony TG. Ascorbic acid supplementation does not alter oxidative stress markers in healthy volunteers engaged in a supervised exercise program. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2016; 41(2): 175-80. DOI: [10.1139/apnm-2015-0285](https://doi.org/10.1139/apnm-2015-0285)

14. Yimcharoen M, Kittikunnathum S, Suknikorn C, Nak-On W, Yeethong P, Anthony TG, et al. Effects of ascorbic acid supplementation on oxidative stress markers in healthy women following a single bout of exercise. *J Int Soc Sports Nutr.* 2019;16(1): 2. DOI: [10.1186/s12970-019-0269-8](https://doi.org/10.1186/s12970-019-0269-8).
15. Raish M, Shahid M, Bin Jordan YA, Ansari MA, Alkharfy KM, Ahad A, et al. Gastroprotective Effect of Sinapic Acid on Ethanol-Induced Gastric Ulcers in Rats: Involvement of Nrf2/HO-1 and NF-κB Signaling and Antiapoptotic Role. *Front Pharmacol.* 2021; 12: 622815. DOI: [10.3389/fphar.2021.622815](https://doi.org/10.3389/fphar.2021.622815).
16. Christodoulou MC, Orellana Palacios JC, Hesami G, Jafarzadeh S, Lorenzo JM, Domínguez R, Moreno A, Hadidi M. Spectrophotometric Methods for Measurement of Antioxidant Activity in Food and Pharmaceuticals. *Antioxidants (Basel).* 2022; 11(11): 2213. DOI: [10.3390/antiox11112213](https://doi.org/10.3390/antiox11112213).
- 17- Wani AL, Ara A, Usmani JA. Lead toxicity: a review. *Interdiscip Toxicol.* 2015; 8(2): 55-64. DOI: [10.1515/intox-2015-0009](https://doi.org/10.1515/intox-2015-0009).
- 18- Assi MA, Hezmee MN, Haron AW, Sabri MY, Rajion MA. The detrimental effects of lead on human and animal health. *Vet World.* 2016; 9(6): 660-71. DOI: [10.14202/vetworld.2016.660-671](https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.660-671).
19. Ren J, Cui J, Chen Q, Zhou N, Zhou Z, Zhang GH, et al. Low-level lead exposure is associated with aberrant sperm quality and reproductive hormone levels in Chinese male individuals: Results from the MARHCS study low-level lead exposure is associated with aberrant sperm quality. *Chemosphere.* 2020; 244: 125402. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2020.125402](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125402).
- 20- Wurlina W, Mustofa I, Meles DK, Khairullah AR, Akintunde AO, Rachmawati K, et al. Restoration of sperm quality in lead acetate-induced rats via treatment with Moringa oleifera leaf extract. *Open Vet J.* 2025; 15(1):416-27. DOI: [10.5455/OVJ.2025.v15.i1.37](https://doi.org/10.5455/OVJ.2025.v15.i1.37).
21. Matsumura T, Katagiri K, Yao T, Yamauch Y, Nagata S, Hashimoto K, et al. Generation of rat offspring using spermatids produced through in vitro spermatogenesis. *Sci Rep.* 2023, 13, 12105. DOI: [10.1038/s41598-023-39304-1](https://doi.org/10.1038/s41598-023-39304-1)
- 22- Patra RC, Rautray AK, Swarup D. Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *Vet Med Int.* 2011; 2011: 457327. DOI: [10.4061/2011/457327](https://doi.org/10.4061/2011/457327).
23. Su LJ, Zhang JH, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 2 019: 5080843. DOI: [10.1155/2019/5080843](https://doi.org/10.1155/2019/5080843)
24. Abu-Khudir R, Almutairi HH, Abd El-Rahman SS, El-Said KS. The Palliative and Antioxidant Effects of Hesperidin against Lead-Acetate-Induced Testicular Injury in Male Wistar Rats. *Biomedicines.* 2023;11(9):2390. DOI: 10.3390.
25. Omobowale TO, Oyagbemi AA, Akinrinde AS, Saba AB, Daramola OT, Ogunpolu BS, et al. Failure of recovery from lead induced hepatotoxicity and disruption of erythrocyte antioxidant defence system in Wistar rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014; 37(3): 1202-11. DOI: [10.1016/j.etap.2014.03.002](https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.03.002).
26. Deng Q, Yu X, Xu J, Liu C, Huang F, Huang Q, Yang J. Effect of flaxseed oil fortified with vitamin E and phytosterols on antioxidant defense capacities and lipids profile in rats. *J Food Sci.* 2012; 77(6): H135-40. DOI: [10.1111/j.1750-3841.2012.02745.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02745.x).
27. Kezimana P, Dmitriev AA, Kudryavtseva AV, Romanova EV, Melnikova NV. Secoisolariciresinol Diglucoside of Flaxseed and Its Metabolites: Biosynthesis and Potential for Nutraceuticals. *Front Genet.* 2018; 9: 641. DOI: [10.3389/fgene.2018.00641](https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00641).
28. Yuan C, Zhang K, Wang Z, Ma X, Liu H, Zhao J, et al. Dietary flaxseed oil and vitamin E improve semen quality via propionic acid metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023; 14:1139725. DOI: [10.3389/fendo.2023.1139725](https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1139725).
- 29- Yin X, Chen K, Cheng H, Chen X, Feng S, Song Y, et al. Chemical Stability of Ascorbic Acid Integrated into Commercial Products: A Review on Bioactivity and Delivery Technology. *Antioxidants (Basel).* 2022; 11(1):153. DOI: [10.3390/antiox11010153](https://doi.org/10.3390/antiox11010153).
30. Ahmadi S, Bashiri R, Ghadiri-Anari A, Nadjarzadeh A. Antioxidant supplements and semen parameters: An evidence based review. *Int J Reprod Biomed.* 2016; 14(12): 29-736. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28066832/>