

ارزیابی اثر بهبودبخش عصاره هیدروآتانولی نعناع فلفلی بر سمیت تولیدمثلی ناشی از متیل تریت-بوتیل اتر در رت‌های نر نژاد ویستار

سما طاهری کمالان، اتابک روحی امینجان*

ایران، همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۵/۱۸

چکیده

متیل تریت-بوتیل اتر (MTBE) یک آلاینده پایدار زیست‌محیطی است که می‌تواند از طریق القای استرس اکسیداتیو موجب آسیب‌های تولیدمثلی شود. نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) نیز به دلیل دارا بودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، دارای ظرفیت بالقوه برای کاهش آسیب‌های ناشی از آلاینده‌های شیمیایی است. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر بهبودبخش عصاره هیدروآتانولی نعناع فلفلی بر اختلالات باروری ناشی از MTBE در رت‌های نر نژاد ویستار انجام شد. در این مطالعه تجربی، ۲۸ سر رت نر بالغ نژاد ویستار به طور تصادفی به چهار گروه هفت‌تایی شامل کنترل، MTBE، دوز پایین و دوز بالای عصاره نعناع فلفلی تقسیم شدند. حیوانات ابتدا به مدت ۲۴ روز MTBE را دریافت کرده و سپس به مدت ۲۴ روز با عصاره هیدروآتانولی نعناع فلفلی تیمار شدند. در پایان مطالعه، سطوح سرمی هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون، پارامترهای اسپرمی، میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و تغییرات بافت‌شناسی بیضه ارزیابی شد. تجویز MTBE موجب کاهش معنی‌دار سطوح LH، FSH و تستوسترون، کاهش تعداد و زنده‌مانی اسپرم، افزایش درصد اسپرم‌های غیرطبیعی، افزایش سطح MDA و بروز تغییرات در بافت بیضه شامل واکوئوله شدن سلول‌های سرتولی و کاهش تراکم سلول‌های لیدینگ در مقایسه با گروه کنترل شد. تجویز عصاره هیدروآتانولی نعناع فلفلی، به‌ویژه در دوز ۲۵۰ mg/kg، موجب بهبود معنی‌دار شاخص‌های هورمونی، اسپرمی و بافتی و کاهش سطح MDA در مقایسه با گروه MTBE شد. اثرات بهبودبخش عصاره وابسته به دوز بود و در دوز بالاتر بیشتر مشاهده شد. بر اساس یافته‌های این مطالعه، عصاره هیدروآتانولی نعناع فلفلی احتمالاً از طریق خواص آنتی‌اکسیدانی خود و کاهش آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از MTBE، در بهبود شاخص‌های باروری نقش دارد و می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب طبیعی امیدبخش در کاهش سمیت تولیدمثلی ناشی از MTBE مطرح شود.

واژه‌های کلیدی: LH، FSH، تستوسترون، پارامترهای اسپرمی، مالون‌دی‌آلدئید (MDA)

*نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱۳۱۴۰۰۰۰، پست الکترونیکی: a.roohiaminjan@basu.ac.ir

مقدمه

متیل ترت-بوتیل اتر (MTBE) یک ترکیب اتری قطبی است که از واکنش متانول و ایزوبوتن تولید می‌شود. این ماده، مایعی فرار، قابل اشتعال و بی‌رنگ با بویی شبیه دی‌اتیل‌اتر است که از اواخر دهه ۱۹۷۰ میلادی در ایالات متحده آمریکا به‌عنوان جایگزین تتراتیل‌سرب و با نسبت ۱۵ درصد حجمی/حجمی به بنزین افزوده شد (۳۷). افزودن MTBE موجب افزایش عدد اکتان بنزین، بهبود احتراق سوخت و در نتیجه انتشار آلاینده‌هایی مانند مونوکسیدکربن و سرب را کاهش می‌دهد (۷).

با وجود مزایای اولیه، تولید گسترده جهانی MTBE (حدود ۲۶ میلیون تن در سال) و کاربرد وسیع آن، منجر به آزادسازی مقادیر قابل توجهی از این ترکیب در محیط زیست شده است که می‌تواند پیامدهای زیان‌باری برای سلامت انسان و اکوسیستم‌ها به همراه داشته باشد (۷، ۴). MTBE به دلیل حلالیت بالا در آب، مقاومت در برابر تجزیه زیستی و تمایل اندک به جذب سطحی در خاک و مواد آلی، به راحتی موجب آلودگی آب‌های زیرزمینی شده و به‌عنوان یک آلاینده پایدار شناخته می‌شود (۷). این ماده از طریق نشت مخازن ذخیره در جایگاه‌های سوخت، خطوط انتقال، وسایل نقلیه، تخلیه‌های تصادفی، پالایشگاه‌ها و نیز تبخیر وارد محیط می‌شود (۳۹).

مواجهه موجودات زنده با MTBE از راه‌های پوستی، استنشاقی و خوراکی صورت می‌گیرد (۳۸). گزارش‌ها نشان می‌دهد که این ترکیب می‌تواند بر سیستم عصبی مرکزی اثر گذاشته و علائمی نظیر اختلال حافظه، افسردگی، لرزش دست، اختلال تعادل، التهاب مزمن بینی، تحریکات چشمی و ضایعات پوستی ایجاد کند (۳۲). همچنین، در جوندگان مواجهه با غلظت‌های بالای MTBE با افزایش بروز برخی تومورها همراه بوده است (۱۴، ۱۶).

متیل ترت-بوتیل اتر در بدن به متابولیت‌هایی از جمله ترت-بوتیل‌الکل (TBA) و فرمالدهید تبدیل می‌شود. بر اساس گزارش آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (IARC)، فرمالدهید در گروه مواد سرطان‌زای قطعی برای انسان طبقه‌بندی شده است (۱۱). TBA نیز دارای نیمه‌عمر طولانی‌تر نسبت به MTBE بوده (۳۳)، به‌طور گسترده در بدن توزیع می‌شود (۲۴) و احتمال ایجاد جهش برای آن مطرح شده است (۲۳). علاوه بر این، مطالعات نشان داده‌اند که MTBE می‌تواند موجب واسرشتگی مولکول هموگلوبین، کاهش پایداری حرارتی آن (۳۴) و کاهش تمایل هموگلوبین به اکسیژن شود (۴۲، ۱). در مدل‌های حیوانی، مصرف خوراکی MTBE با بروز درجاتی از سمیت در سیستم‌های تنفسی، گوارشی، خونی، کبدی، کلیوی و عصبی همراه بوده است (۲۹). علاوه بر سمیت عمومی، شواهد موجود نشان می‌دهد که MTBE می‌تواند عملکرد دستگاه تولیدمثل نر را نیز تحت تأثیر قرار دهد. اختلال در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد، کاهش سطوح هورمون‌های جنسی، آسیب بافت بیضه، اختلال در اسپرماتوژنز و افزایش استرس اکسیداتیو از جمله پیامدهای گزارش شده مواجهه با این آلاینده در مدل‌های حیوانی هستند. از آنجا که استرس اکسیداتیو یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های ایجاد سمیت تولیدمثلی ناشی از مواد شیمیایی محسوب می‌شود، شناسایی ترکیبات طبیعی با قابلیت کاهش آسیب‌های اکسیداتیو از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۲).

در سال‌های اخیر توجه فزاینده‌ای به استفاده از گیاهان دارویی به‌عنوان عوامل محافظت‌کننده و بهبودبخش در برابر آسیب‌های ناشی از آلاینده‌های شیمیایی معطوف شده است. مطالعات متعددی اثر عصاره‌های گیاهی را بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد و شاخص‌های باروری در پستانداران آزمایشگاهی بررسی کرده‌اند (۲). نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) از خانواده Lamiaceae، گیاهی معطر و هیبرید حاصل از تلاقی *Mentha aquatica* و *Mentha spicata* است. این گیاه حاوی بیش از ۳۰۰ ترکیب شیمیایی فعال بوده (۲۵) و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضدتوموری، تعدیل‌کننده ایمنی و ضدحساسیت است (۵). ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در نعناع فلفلی، از جمله منتول و اسید رزمارینیک، در خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو نقش مهمی ایفا می‌کنند. از این‌رو، این گیاه می‌تواند به‌عنوان یک گزینه امیدبخش برای کاهش آسیب‌های تولیدمثلی ناشی از آلاینده‌های شیمیایی مطرح باشد.

با وجود مطالعات متعدد درباره سمیت MTBE و خواص آنتی‌اکسیدانی نعناع فلفلی، تاکنون مطالعه‌ای درباره اثر عصاره هیدروآتانولی نعناع فلفلی بر اختلالات باروری ناشی از MTBE در رت‌های نر نژاد ویستار انجام نشده است. با توجه به نقش محوری استرس اکسیداتیو در بروز آسیب‌های تولیدمثلی ناشی از MTBE، فرض بر این است که عصاره هیدروآتانولی نعناع فلفلی بتواند این آسیب‌ها را کاهش دهد. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر بهبودبخش عصاره هیدروآتانولی نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) بر شاخص‌های باروری و هورمون‌های تولیدمثلی در رت‌های نر نژاد ویستار تیمار شده با MTBE انجام شد.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

این مطالعه تجربی پس از تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه بوعلی سینا با کد اخلاق IR.BASU.REC.1402.089، (مورخ ۱۴۰۲/۱۲/۸) انجام شد. در این پژوهش، از ۲۸ سر رت نر بالغ نژاد ویستار با محدوده وزنی ۱۹۰ تا ۲۴۰ گرم که از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه بوعلی سینا تهیه شده بودند، استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد دمایی (22 ± 2) درجه سانتی‌گراد و چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، در قفس‌های پلی‌کربنات دارای بستر پوشالی و با دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد در حیوانخانه گروه زیست‌شناسی دانشگاه بوعلی سینا نگهداری شدند.

گروه‌بندی حیوانات آزمایشگاهی

رت‌ها به‌صورت تصادفی در چهار گروه (هر گروه شامل ۷ سر رت) تقسیم شدند. پیش از شروع آزمایش، وزن تمامی حیوانات اندازه‌گیری شد و همگنی میانگین وزن گروه‌ها از نظر آماری مورد تایید قرار گرفت ($P > 0.05$). گروه‌های آزمایشی به شرح زیر بودند:

*گروه کنترل (Co): دریافت‌کننده روغن زیتون (حلال MTBE).

*گروه MTBE: دریافت‌کننده MTBE با دوز 800 mg/kg/day (۱۸) بدون دریافت عصاره هیدروآتانولی نعناع فلفلی.

*گروه دوز پایین (LD): دریافت‌کننده MTBE و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز mg/kg/day ۱۰۰.

*گروه دوز بالا (HD): دریافت‌کننده MTBE و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز mg/kg/day ۲۵۰.

تهیه عصاره گیاهی

عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی (*Mentha piperita* L.) بر اساس روش Arruda و همکاران تهیه شد (۱۲). از عصاره غلیظ تهیه شده برای آماده‌سازی محلول‌های با دوزهای mg/kg/day ۱۰۰ (دوز پایین) و mg/kg/day ۲۵۰ (دوز بالا) (۳۵) استفاده شد.

شیوه انجام آزمایش

مطالعه در دو دوره متوالی ۲۴ روزه انجام شد. در دوره نخست، گروه‌های MTBE، LD و HD، متیل‌ترت-بوتیل اتر حل‌شده در روغن زیتون را با دوز mg/kg/day ۸۰۰ (۱۸) دریافت کردند، در حالی که گروه کنترل تنها روغن زیتون دریافت کرد. در دوره دوم، به‌منظور بررسی اثر بهبودبخشی عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی بر آسیب‌های القاشده توسط MTBE، گروه‌های LD و HD به‌ترتیب عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی را با دوزهای mg/kg/day ۱۰۰ و mg/kg/day ۲۵۰ دریافت کردند و گروه‌های کنترل و MTBE با آب گاوآذ شدند. وزن حیوانات در ابتدای مطالعه و در پایان هر دوره آزمایشی اندازه‌گیری و ثبت شد. در همه گروه‌ها، گاوآذ به‌صورت روزانه و با استفاده از سرنگ ۵ میلی‌لیتری و سوزن مخصوص گاوآذ رت انجام شد. حجم ماده تجویزی برای هر حیوان در هر نوبت گاوآذ، ۱ میلی‌لیتر بود.

بی‌هوشی، خون‌گیری و سنجش هورمونی

در پایان دوره آزمایش، حیوانات با تزریق درون‌صفاقی کتامین (۹۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بی‌هوش شدند. پس از بی‌هوشی کامل، نمونه‌گیری خون از بزرگ سیاهرگ زیرین انجام شد. نمونه‌های خون پس از سانتریفیوژ در ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، برای جداسازی سرم مورد استفاده قرار گرفتند و سرم‌های حاصل تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سنجش غلظت سرمی هورمون‌های تستوسترون، LH و FSH به‌ترتیب با استفاده از کیت‌های الیزا ساخت شرکت Monobind (آمریکا) و شرکت پیشتاز طب (ایران)، براساس شیوه‌نامه شرکت‌های سازنده انجام شد. به‌منظور ارزیابی استرس اکسیداتیو ناشی از مواجهه با MTBE، غلظت سرمی مالون‌دی‌آلدئید (MDA) با استفاده از کیت تجاری شرکت کیازیت، براساس شیوه‌نامه شرکت سازنده اندازه‌گیری شد.

مطالعات بافت‌شناسی

پس از خون‌گیری، بیضه‌ها جدا شدند و پس از وزن‌گیری در محلول فرمالین بافر ۱۰ درصد به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند. سپس مراحل پاساژ بافتی، قالب‌گیری در پارافین، برش‌گیری و رنگ‌آمیزی انجام شد (۴۰).

لام‌های تهیه‌شده با میکروسکوپ نوری مدل LABOMED LX50 متصل به دوربین دیجیتال LABOMED iVu3100 مطالعه و تصویربرداری انجام شد.

ارزیابی پارامترهای اسپرمی

استخراج اسپرم از اپیدیدیم بر اساس روش اسدی و همکاران (۲۰۱۴) انجام شد (۱۳). تعداد اسپرم‌ها براساس روش استاندارد شمارش شد. برای تعیین درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها از روش رنگ‌آمیزی دو مرحله‌ای اتوزین-نیگروزین استفاده شد (۱۳، ۳۱). همچنین، ارزیابی ریختی اسپرم‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی اتوزین انجام شد و ناهنجاری‌هایی نظیر دم پیچ‌خورده، دم بدون سر، سر بدون دم و سر دوتایی به‌عنوان اسپرم‌های غیرطبیعی ثبت شدند (۳۱).

تحلیل آماری

داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 10.6.1 تحلیل شدند. نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون Kolmogorov-Smirnov بررسی شد. برای مقایسه میانگین گروه‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و برای مقایسه‌های دو به دو از آزمون پسین Tukey استفاده شد. همچنین برای مقایسه وزن حیوانات در دوره‌های مختلف در هر گروه از آزمون t زوجی (Paired Samples t-test) بهره گرفته شد. سطح معنی‌داری آماری در تمامی آزمون‌ها برابر با $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار میانگین (Mean $\pm$ SEM) ارائه شده‌اند.

نتایج

در شروع مطالعه، میانگین وزن رت‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی تفاوت معنی‌دار نداشت ($P > 0.05$). همچنین، در پایان دوره‌های اول و دوم آزمایش نیز اختلاف معنی‌داری در میانگین وزن حیوانات میان گروه‌های مختلف مشاهده نشد (جدول ۱).

بررسی تغییرات وزن در هر گروه در مراحل مختلف آزمایش نشان داد که در گروه‌های کنترل و دوز پایین، وزن حیوانات در طول مطالعه به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. در گروه MTBE، وزن حیوانات پس از پایان دوره اول افزایش و در پایان دوره دوم کاهش یافت، اما این تغییرات معنی‌دار نبودند. در گروه دوز بالا نیز وزن حیوانات پس از پایان دوره نخست افزایش یافت (غیرمعنی‌دار)، اما در پایان دوره دوم کاهش معنی‌داری نسبت به وزن ثبت شده در شروع مطالعه مشاهده شد (جدول ۱).

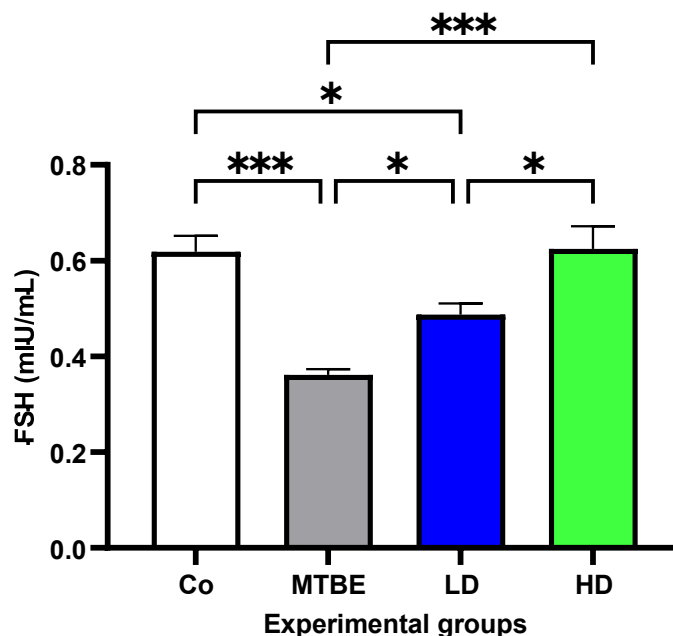
جدول ۱. مقایسه وزن رت‌ها در مراحل مختلف آزمایش و در میان گروه‌های مختلف آزمایشی.

گروه #	وزن اول * (g) (Mean $\pm$ SEM)	وزن دوم * (g) (Mean $\pm$ SEM)	وزن سوم * (g) (Mean $\pm$ SEM)	وزن نسبی بیضه	آزمون t زوجی		
					وزن اول با دوم	وزن اول با سوم	وزن دوم با سوم
کنترل (n = 7)	220 $\pm$ 11	241 $\pm$ 8	261 $\pm$ 9	1/35 $\pm$ 0/014	t = -5/054 P = 0/004	t = -16/064 P < 0/001	t = -6/874 P = 0/001
#MTBE (n = 7)	213 $\pm$ 14	227 $\pm$ 9	222 $\pm$ 12	1/16 $\pm$ 0/009	t = -2/075 P = 0/083	t = -1/223 P = 0/267	t = 1/174 P = 0/285
دوز پایین #	213 $\pm$ 12	228 $\pm$ 12	254 $\pm$ 13	1/23 $\pm$ 0/012	t = -5/064 P = 0/004	t = -5/939 P = 0/001	t = -3/270 P = 0/012

$P = ۰/۰۱۷$	$P = ۰/۰۰۱$	$P = ۰/۰۰۲$					(n = ۷)
$t = ۲/۶۹۹$ $P = ۰/۰۳۶$	$t = ۲/۱۰۸$ $P = ۰/۰۸۰$	$t = -۰/۹۳۱$ $P = ۰/۳۸۸$	$۱/۳۰ \pm ۰/۰۱۴$	۲۳۰ ± ۱۱	۲۴۶ ± ۱۱	۲۲۲ ± ۷	دوز بالا# (n = ۷)
---	---	---	$F_{(۳,۲۴)} = ۴۵/۹۰$ $P < ۰/۰۰۱$	$F_{(۳,۲۴)} = ۲/۴۶۳$ $P = ۰/۰۸۸$	$F_{(۳,۲۴)} = ۰/۸۹۹$ $P = ۰/۴۵۷$	$F_{(۳,۲۴)} = ۱/۵۰۰$ $P = ۰/۲۴۰$	ANOVA

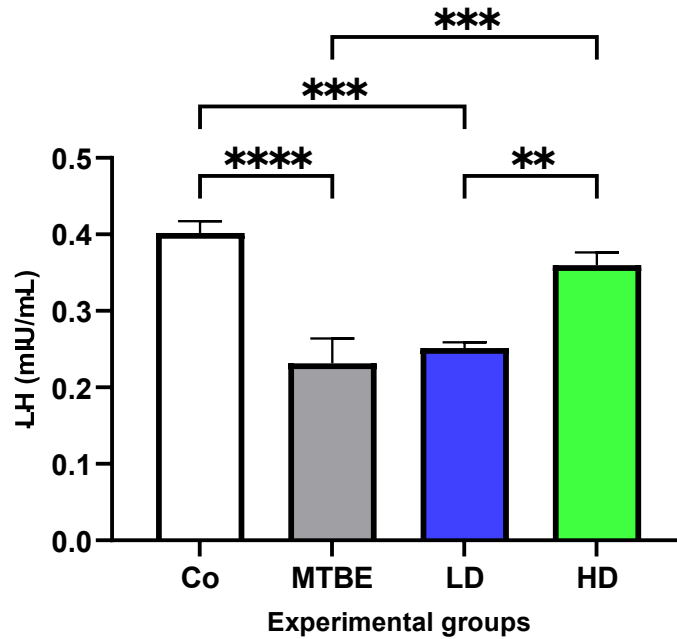
*وزن اول: وزن قبل از شروع آزمایش؛ وزن دوم: وزن بعد از گاوآژ متیل تریت-بوتیل اتر؛ وزن سوم: وزن بعد از گاوآژ عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی.
#گروه کنترل: دریافت‌کننده روغن زیتون به‌عنوان حلال متیل تریت-بوتیل اتر؛ گروه MTBE: دریافت‌کننده متیل تریت-بوتیل اتر با دوز ۸۰۰ mg/kg/day؛ گروه دوز پایین: دریافت‌کننده متیل تریت-بوتیل اتر و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز ۱۰۰ mg/kg/day؛ گروه دوز بالا: دریافت‌کننده متیل تریت-بوتیل اتر و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز ۲۵۰ mg/kg/day.

مقایسه غلظت سرمی هورمون FSH در گروه‌های مختلف آزمایشی نشان داد که میانگین این هورمون در گروه MTBE به‌طور معنی‌دار کمتر از سایر گروه‌ها بود. در مقابل، میانگین FSH در گروه‌های کنترل و دوز بالا تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشت، در حالی که در هر دو گروه به‌طور معنی‌دار بیشتر از گروه دوز پایین بود ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل ۱).



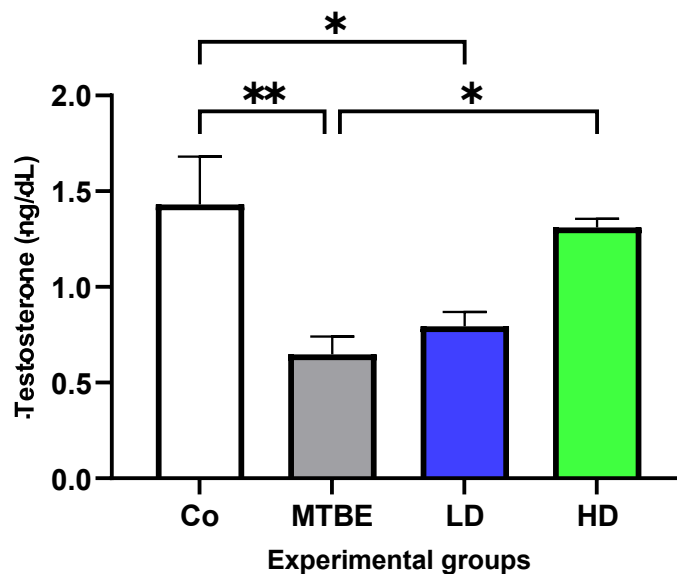
شکل ۱. میانگین غلظت هورمون FSH سرمی رت‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی؛ Co: گروه کنترل، دریافت‌کننده روغن زیتون به‌عنوان حلال متیل تریت-بوتیل اتر؛ MTBE: گروه متیل تریت-بوتیل اتر، دریافت‌کننده متیل تریت-بوتیل اتر با دوز ۸۰۰ mg/kg/day؛ LD: گروه دوز پایین، دریافت‌کننده متیل تریت-بوتیل اتر و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز ۱۰۰ mg/kg/day؛ HD: گروه دوز بالا، دریافت‌کننده متیل تریت-بوتیل اتر و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز ۲۵۰ mg/kg/day. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد (mean $\pm$ SEM) نشان داده شده‌اند (n = ۷ برای همه گروه‌ها). *، $P < ۰/۰۰۵$ ؛ ***، $P < ۰/۰۰۱$.

میانگین هورمون LH در گروه‌های کنترل و دوز بالا تفاوت معنی‌دار با یکدیگر نداشت، اما در هر دو گروه به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های MTBE و دوز پایین بود ($P < ۰/۰۰۰۱$) ($F_{(۳,۲۴)} = ۱۵/۶۷$) (شکل ۲).



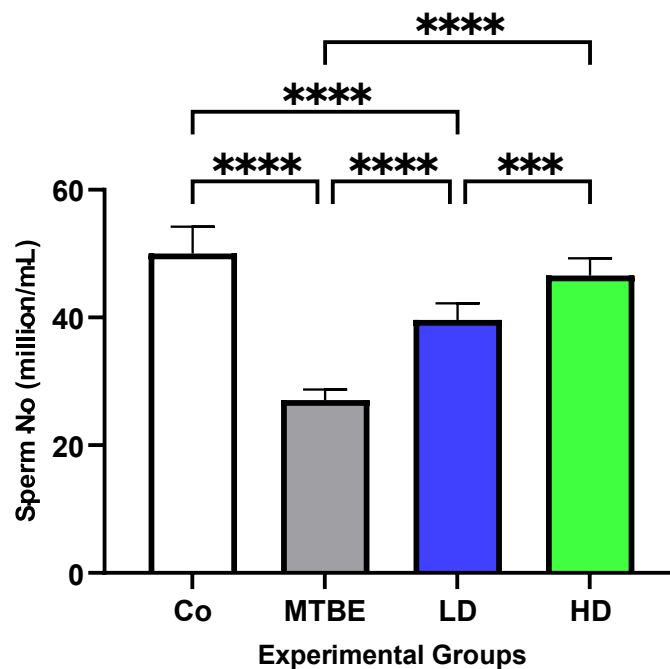
شکل ۲. میانگین غلظت هورمون LH سرمی رت‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی؛ Co: گروه کنترل، دریافت‌کننده روغن زیتون به‌عنوان حلال متیل ترت-بوتیل اتر؛ MTBE: گروه متیل ترت-بوتیل اتر، دریافت‌کننده متیل ترت-بوتیل اتر با دوز mg/kg/day ۸۰۰؛ LD: گروه دوز پایین، دریافت‌کننده متیل ترت-بوتیل اتر و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز mg/kg/day ۲۵۰؛ HD: گروه دوز بالا، دریافت‌کننده متیل ترت-بوتیل اتر و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز mg/kg/day ۲۵۰. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد (mean $\pm$ SEM) نشان داده شده‌اند ($n = 7$ برای همه گروه‌ها). $P < 0.01$ ، $***$ ؛ $P < 0.001$ ، $****$ ؛ $P < 0.0001$ ، $*****$.

بررسی غلظت سرمی تستوسترون در گروه‌های مختلف نشان داد که میزان این هورمون در دو گروه MTBE و دوز پایین در مقایسه با گروه کنترل و نیز در گروه MTBE نسبت به گروه دوز بالا به طور معنی‌دار کمتر بود ($F_{(3, 24)} = 7.038$ ، $P = 0.002$) (شکل ۳).

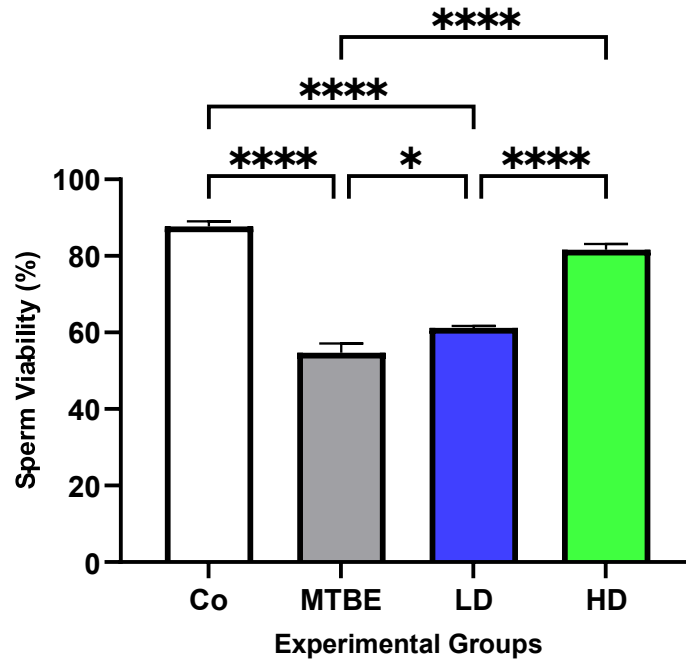


شکل ۳. مقایسه غلظت هورمون تستوسترون سرمی در گروه‌های مختلف آزمایشی؛ Co: گروه کنترل، دریافت‌کننده روغن زیتون به‌عنوان حلال متیل ترت-بوتیل اتر؛ MTBE: گروه متیل ترت-بوتیل اتر، دریافت‌کننده متیل ترت-بوتیل اتر با دوز mg/kg/day ۸۰۰؛ LD: گروه دوز پایین، دریافت‌کننده متیل ترت-بوتیل اتر و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز mg/kg/day ۱۰۰؛ HD: گروه دوز بالا، دریافت‌کننده متیل ترت-بوتیل اتر و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز mg/kg/day ۲۵۰. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد (mean $\pm$ SEM) نشان داده شده‌اند (n = ۷ برای همه گروه‌ها). *، $P < ۰/۰۰۵$ ؛ **، $P < ۰/۰۰۱$ ؛ ***، $P < ۰/۰۰۰۱$.

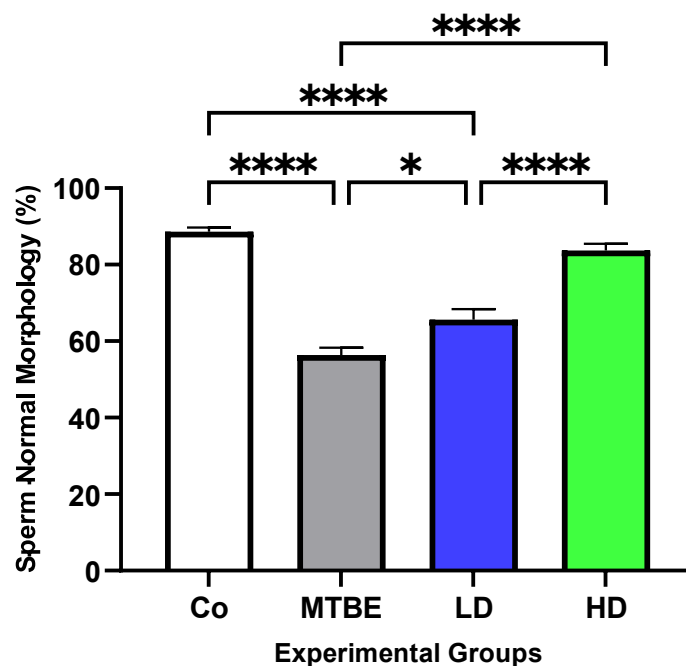
بررسی پارامترهای اسپرمی در گروه‌های مختلف آزمایشی نشان داد که تعداد اسپرم در گروه MTBE به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر گروه‌ها بود و گروه دوز پایین نیز در مقایسه با گروه‌های کنترل و دوز بالا کاهش معنی‌داری را نشان داد ($F_{(۳,۲۴)} = ۸۳/۴۷$ ، $P < ۰/۰۰۰۱$) (شکل ۴). همچنین، درصد زنده‌مانی اسپرم در گروه MTBE به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر گروه‌ها بود و در گروه دوز پایین نیز نسبت به گروه‌های کنترل و دوز بالا کاهش معنی‌داری مشاهده شد ($F_{(۳,۲۴)} = ۹۹/۰۱$ ، $P < ۰/۰۰۰۱$) (شکل ۵). بررسی درصد اسپرم‌های طبیعی نیز الگوی مشابهی را نشان داد؛ به‌طوری‌که این شاخص در گروه MTBE به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر گروه‌ها بود و گروه دوز پایین نیز مقادیر کمتری نسبت به گروه‌های کنترل و دوز بالا داشت ($P < ۰/۰۰۰۱$) (شکل ۶). $F_{(۳,۲۴)} = ۵۹/۳۰$ ، $P < ۰/۰۰۰۱$.



شکل ۴. مقایسه تعداد اسپرم در گروه‌های مختلف آزمایشی؛ Co: گروه کنترل، دریافت‌کننده روغن زیتون به‌عنوان حلال متیل ترت-بوتیل اتر؛ MTBE: گروه متیل ترت-بوتیل اتر، دریافت‌کننده متیل ترت-بوتیل اتر با دوز LD ۸۰۰ mg/kg/day؛ گروه دوز پایین، دریافت‌کننده متیل ترت-بوتیل اتر و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز HD ۱۰۰ mg/kg/day؛ گروه دوز بالا، دریافت‌کننده متیل ترت-بوتیل اتر و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز ۲۵۰ mg/kg/day. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد (mean $\pm$ SEM) نشان داده شده‌اند (n = ۷ برای همه گروه‌ها). *، $P < ۰/۰۰۱$ ؛ **، $P < ۰/۰۰۰۱$ ؛ ***، $P < ۰/۰۰۰۰۱$ ؛ ****، $P < ۰/۰۰۰۰۰۱$.



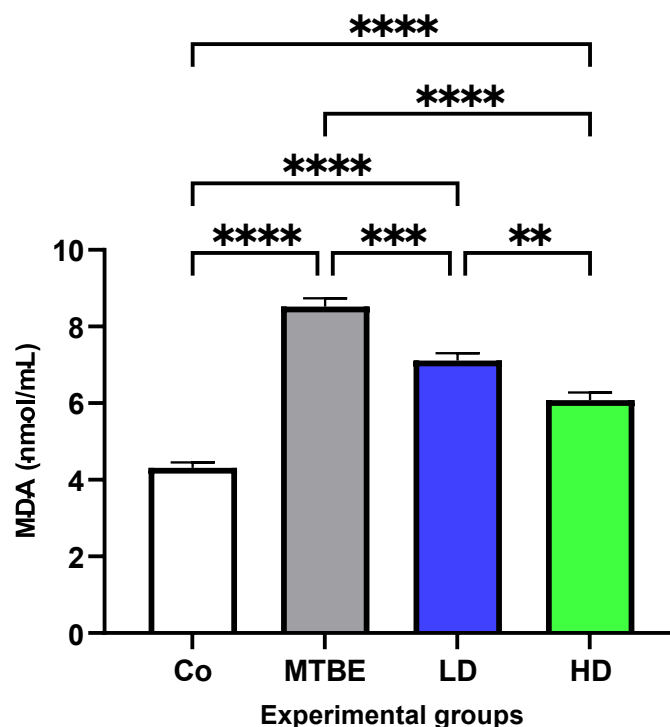
شکل ۵. مقایسه درصد اسپرم‌های زنده در گروه‌های مختلف آزمایشی؛ Co: گروه کنترل، دریافت‌کننده روغن زیتون به‌عنوان حلال متیل تریت-بوتیل اتر؛ MTBE: گروه متیل تریت-بوتیل اتر، دریافت‌کننده متیل تریت-بوتیل اتر با دوز ۸۰۰ mg/kg/day؛ LD: گروه دوز پایین، دریافت‌کننده متیل تریت-بوتیل اتر و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز ۱۰۰ mg/kg/day؛ HD: گروه دوز بالا، دریافت‌کننده متیل تریت-بوتیل اتر و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز ۲۵۰ mg/kg/day. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد (mean $\pm$ SEM) نشان داده شده‌اند ($n = 7$ برای همه گروه‌ها). *، $P < 0.05$ ؛ ****، $P < 0.0001$.



شکل ۶. مقایسه درصد اسپرم‌های طبیعی در گروه‌های مختلف آزمایشی؛ Co: گروه کنترل، دریافت‌کننده روغن زیتون به‌عنوان حلال متیل تریت-بوتیل اتر؛ MTBE: گروه متیل تریت-بوتیل اتر، دریافت‌کننده متیل تریت-بوتیل اتر با دوز ۸۰۰ mg/kg/day؛ LD: گروه دوز پایین، دریافت‌کننده متیل تریت-بوتیل اتر و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز ۱۰۰ mg/kg/day؛ HD: گروه دوز بالا، دریافت‌کننده متیل تریت-بوتیل اتر و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز ۲۵۰ mg/kg/day. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد (mean $\pm$ SEM) نشان داده شده‌اند ($n = 7$ برای همه گروه‌ها). *، $P < 0.05$ ؛ ****، $P < 0.0001$.

LD: گروه دوز پایین، دریافت‌کننده متیل‌ترت-بوتیل‌اتر و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز ۱۰۰ mg/kg/day؛ HD: گروه دوز بالا، دریافت‌کننده متیل‌ترت-بوتیل‌اتر و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز ۲۵۰ mg/kg/day. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد (mean $\pm$ SEM) نشان داده شده‌اند ($n = 7$ برای همه گروه‌ها). $P < 0.05$ ؛ ****، $P < 0.0001$.

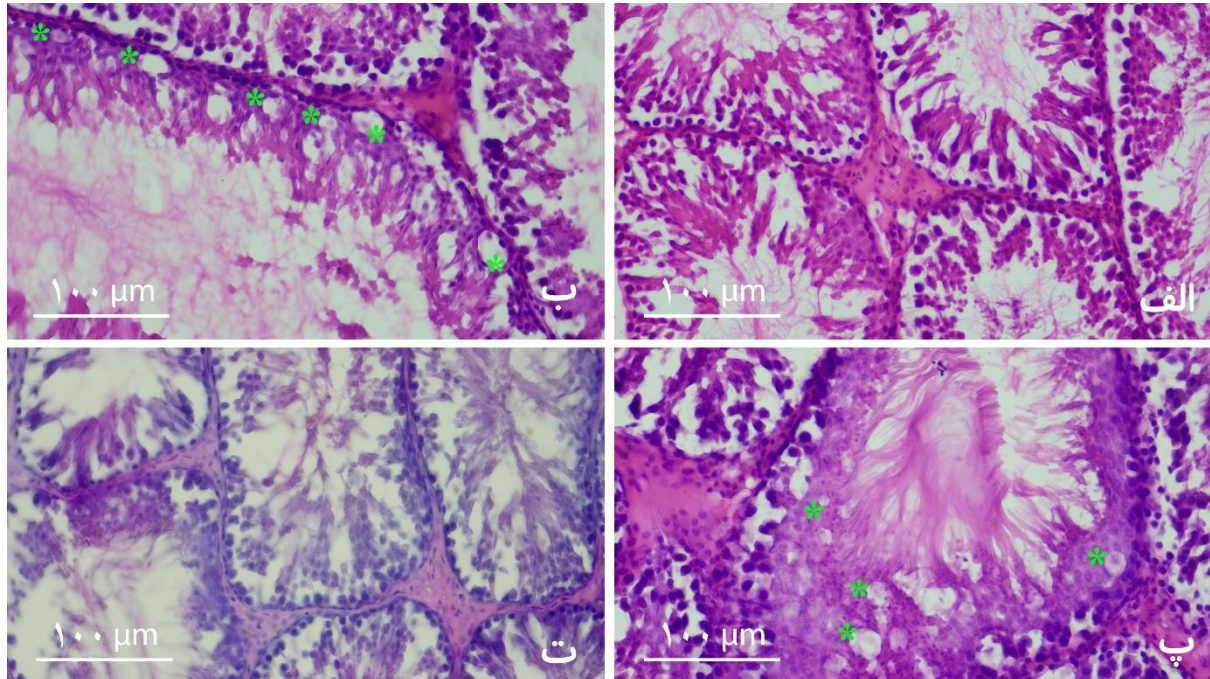
سطح مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در گروه دریافت‌کننده MTBE در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. تجویز عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی در هر دو دوز موجب کاهش معنی‌دار سطح MDA نسبت به گروه MTBE شد. همچنین، میزان MDA در گروه دریافت‌کننده دوز بالای عصاره در مقایسه با گروه دریافت‌کننده دوز پایین به‌طور معنی‌داری کمتر بود، با این حال مقادیر MDA در هر دو گروه تیمار همچنان در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری بالاتر باقی ماند ($F_{(3,24)} = 87.53$ ، $P < 0.0001$) (شکل ۷).



شکل ۷. مقایسه میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در گروه‌های مختلف آزمایشی؛ Co: گروه کنترل، دریافت‌کننده روغن زیتون به‌عنوان حلال متیل‌ترت-بوتیل‌اتر؛ MTBE: گروه متیل‌ترت-بوتیل‌اتر، دریافت‌کننده متیل‌ترت-بوتیل‌اتر با دوز ۱۰۰ mg/kg/day؛ LD: گروه دوز پایین، دریافت‌کننده متیل‌ترت-بوتیل‌اتر و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز ۱۰۰ mg/kg/day؛ HD: گروه دوز بالا، دریافت‌کننده متیل‌ترت-بوتیل‌اتر و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز ۲۵۰ mg/kg/day. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد (mean $\pm$ SEM) نشان داده شده‌اند ($n = 7$ برای همه گروه‌ها). $P < 0.05$ ؛ ****، $P < 0.0001$.

بررسی بافت‌شناسی بیضه‌ها نشان داد که مواجهه با MTBE موجب بروز تغییرات ساختاری در بافت بیضه شده است. در گروه MTBE، واکوئوله شدن سلول‌های سرتولی و کاهش تراکم سلول‌های لایدیگ در فضای بین لوله‌های اسپرم‌ساز نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (شکل ۸ب در مقایسه با شکل ۸الف). در گروه دوز پایین، شدت این تغییرات کاهش یافته بود، هرچند تراکم سلول‌های لایدیگ همچنان کمتر از گروه کنترل

بود (شکل ۸پ). در گروه دوز بالا، ساختار لوله‌های اسپرم‌ساز و فضای بین‌لوله‌ای تا حد زیادی مشابه گروه کنترل مشاهده شد و بهبود قابل توجهی در سازمان بافتی بیضه نسبت به گروه MTBE وجود داشت (شکل ۸ت).



شکل ۸. تصویر برش بافتی از بیضه رت‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی. الف: گروه کنترل، دریافت‌کننده روغن زیتون به عنوان حلال متیل تریت-بوتیل اتر؛ ب: گروه MTBE، دریافت‌کننده متیل تریت-بوتیل اتر با دوز ۸۰۰ mg/kg/day؛ LD: گروه دوز پایین، دریافت‌کننده متیل تریت-بوتیل اتر و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز ۱۰۰ mg/kg/day؛ HD: گروه دوز بالا، دریافت‌کننده متیل تریت-بوتیل اتر و سپس عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی با دوز ۲۵۰ mg/kg/day. *، واکوئل‌های داخل سلول‌های سرتولی را نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که مواجهه با MTBE به مدت ۲۴ روز در رت‌های نر بالغ نژاد ویستار، موجب کاهش معنی‌دار سطح سرمی هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون، کاهش تعداد و زنده‌مانی اسپرم، افزایش درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و ایجاد تغییرات در بافت بیضه شامل واکوئل شدن سلول‌های سرتولی و کاهش تراکم سلول‌های لیدینگ شد. در مقابل، تجویز عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی، به ویژه در دوز ۲۵۰ mg/kg، توانست بسیاری از این تغییرات را به طور معنی‌داری بهبود بخشد. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو احتمالاً نقش مهمی در سمیت ناشی از MTBE ایفا می‌کند و عصاره نعنای فلفلی، به دلیل خواص آنتی‌اکسیدان خود، می‌تواند شدت این آسیب‌ها را کاهش دهد.

در مطالعه حاضر، تجویز متیل تریت-بوتیل اتر موجب افزایش معنی‌دار سطح سرمی مالون‌دی‌آلدئید (MDA) شد که بیانگر افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و بروز استرس اکسیداتیو است. MDA یکی از مهم‌ترین فرآورده‌های نهایی پراکسیداسیون لیپیدی بوده و افزایش آن به عنوان شاخصی معتبر برای ارزیابی آسیب اکسیداتیو و تخریب غشاهای سلولی شناخته می‌شود. بنابراین، افزایش معنی‌دار MDA در گروه دریافت‌کننده

MTBE نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو احتمالاً یکی از مکانیسم‌های اصلی آسیب‌های تولیدمثلی ناشی از این ترکیب بوده است (Bus et al., 2022). با این حال، از آنجا که سایر شاخص‌های استرس اکسیداتیو و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در این مطالعه ارزیابی نشدند، اظهار نظر قطعی در خصوص تمامی مسیرهای مولکولی درگیر در سمیت MTBE امکان‌پذیر نیست.

در مقابل، تجویز عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی در هر دو دوز موجب کاهش معنی‌دار سطح MDA نسبت به گروه MTBE شد و این کاهش در دوز بالاتر بیشتر بود. این یافته نشان می‌دهد که اثرات بهبودبخش عصاره احتمالاً ناشی از ترکیبات زیست‌فعال آن، از جمله ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی مانند اسید رزمارینیک، اریوسیتین، لوتئولین و هسپریدین است که با مهار گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، در کاهش آسیب اکسیداتیو نقش دارند (Mahendran & Rahman, 2020; Hudz et al., 2023). کاهش وابسته به دوز MDA در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره نیز مؤید آن است که افزایش مقدار عصاره موجب تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش بیشتر آسیب اکسیداتیو شده است. با وجود این، بالاتر بودن سطح MDA در هر دو گروه دریافت‌کننده عصاره نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد که اگرچه عصاره نعنای فلفلی توانسته است شدت آسیب اکسیداتیو ناشی از MTBE را به‌طور قابل توجهی کاهش دهد، اما در شرایط این مطالعه نتوانسته است آسیب ایجادشده را به‌طور کامل جبران کند.

در این مطالعه، کاهش معنی‌دار سطوح LH، FSH و تستوسترون در گروه MTBE مشاهده شد. این نتایج با مطالعات متعددی همخوانی دارد که نشان داده‌اند MTBE و متابولیت آن، TBA، می‌توانند با اختلال در تنظیم بازخورد محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد (HPG)، ترشح گنادوتروپین‌ها را تحت تأثیر قرار دهند (۲۰، ۲۷). کاهش LH مشاهده‌شده در مطالعه حاضر ممکن است ناشی از اثرات MTBE در سطح هیپوتالاموس یا هیپوفیز باشد. برخی مطالعات کاهش LH را فقط در دوزهای بالاتر MTBE گزارش کرده‌اند (۲۰، ۲۶)، در حالی که برخی دیگر افزایش یا عدم تغییر این هورمون را نشان داده‌اند (۲۱، ۱۹). این تفاوت‌ها احتمالاً به اختلاف در گونه جانوری، دوز مصرفی، مدت زمان مواجهه و مسیر تجویز مربوط می‌باشد. کاهش FSH در مطالعه حاضر نیز با گزارش‌هایی مبنی بر کاهش این هورمون پس از مواجهه با بخار بنزین (۱۰) همسو است، هرچند بسیاری از مطالعات تغییر معنی‌داری در FSH گزارش نکرده‌اند (۲۰، ۲۶). همچنین، کاهش تستوسترون مشاهده شده در این مطالعه با یافته‌های اغلب مطالعات پیشین (۳، ۲۰، ۴۱) مطابقت دارد و ممکن است ناشی از آسیب اکسیداتیو بر سلول‌های لیدیگ، اختلال در پاسخ این سلول‌ها به LH و یا افزایش متابولیسم کبدی تستوسترون باشد (۲۰، ۲۷).

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که MTBE می‌تواند موجب افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول شود که در نهایت به آسیب سلول‌های زایا و سلول‌های لیدیگ منجر می‌شود (۲۷، ۲۹، ۴۵، ۲۸). کاهش سطح تستوسترون مشاهده شده در مطالعه حاضر نیز می‌تواند تا حدی ناشی از آسیب اکسیداتیو به سلول‌های لیدیگ باشد، زیرا این سلول‌ها برای سنتز استروئید به یکپارچگی غشای میتوکندری وابسته هستند و افزایش ROS ممکن است عملکرد آن‌ها را مختل کند (۴۵، ۱۷). علاوه بر این، القای آنزیم‌های CYP کبدی توسط MTBE نیز می‌تواند در کاهش سطح تستوسترون نقش داشته باشد (۲۰).

یافته‌های بافت‌شناسی پژوهش حاضر شامل بی‌نظمی اپیتلیوم زاینده، واکوئوله شدن سلول‌های سرتولی و کاهش تراکم سلول‌های لیدیک در گروه MTBE بود. این نتایج با گزارش‌های پیشین مبنی بر ایجاد آتروفی لوله‌های اسپرم‌ساز، کاهش سلول‌های زاینده و تغییرات سلول‌های لیدیک در حیوانات تیمار شده با MTBE همخوانی دارد (۱۵، ۹، ۲۷، ۲۲). همچنین، کاهش تعداد و زنده‌مانی اسپرم و افزایش درصد اسپرم‌های غیرطبیعی در مطالعه حاضر توسط سایر محققان نیز گزارش شده است (۲۷، ۳۰). به نظر می‌رسد MTBE با آسیب به سلول‌های سرتولی، که نقش حمایتی و تغذیه‌ای در فرآیند اسپرماتوژنز دارند، و همچنین از طریق القای استرس اکسیداتیو، موجب اختلال در تولید و بلوغ اسپرم می‌شود (۲۹، ۲۸).

نتایج این پژوهش نشان داد که تجویز عصاره هیدوراتانولی نعنای فلفلی، به ویژه در دوز ۲۵۰ mg/kg، موجب افزایش معنی‌دار سطوح LH، FSH و تستوسترون، بهبود پارامترهای اسپرمی و کاهش آسیب‌های بافتی بیضه در مقایسه با گروه MTBE شد. این اثرات بهبودبخش را می‌توان به ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره نعنای فلفلی نسبت داد. نعنای فلفلی حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها و ترپنوئیدهایی نظیر اسید رزمارینیک، منتول و منتون است که توانایی مهار رادیکال‌های آزاد و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی را دارند (۲۵، ۵، ۸، ۴۴). مطالعات پیشین نیز نشان داده‌اند که عصاره نعنای فلفلی می‌تواند از سلول‌های بیضه در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از مواد شیمیایی مختلف محافظت کند (۳۶).

بهبود سطح تستوسترون در گروه‌های تیمار احتمالاً ناشی از کاهش استرس اکسیداتیو و حفظ سلامت سلول‌های لیدیک است. علاوه بر این، برخی مطالعات نشان داده‌اند که ترکیبات فلاونوئیدی موجود در گیاهان دارویی ممکن است در تنظیم متابولیسم هورمون‌های جنسی و فعالیت آنزیم‌های مرتبط با آن نقش داشته باشند (۲). هرچند بررسی این مکانیسم‌ها در مطالعه حاضر انجام نشده است. همچنین، افزایش LH مشاهده‌شده در گروه‌های تیمار ممکن است ناشی از بهبود عملکرد محور HPG در پی کاهش استرس اکسیداتیو باشد، اما برای تأیید این فرضیه انجام مطالعات مولکولی و بیوشیمیایی تکمیلی ضروری است (۶). در این مطالعه، دوز پایین عصاره نعنای فلفلی (۱۰۰ mg/kg) نیز تا حدودی اثرات بهبودی نشان داد، اما دوز ۲۵۰ mg/kg به طور قابل توجهی مؤثرتر بود. این الگوی پاسخ وابسته به دوز، مؤید آن است که افزایش مقدار عصاره با بهبود بیشتر شاخص‌های تولیدمثلی و کاهش آسیب‌های ناشی از MTBE همراه بوده است (۲).

محدودیت‌های مطالعه

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به تعداد نسبتاً محدود حیوانات آزمایشگاهی، اندازه‌گیری تنها یکی از شاخص‌های استرس اکسیداتیو (MDA)، عدم ارزیابی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر SOD، GPx و CAT و همچنین عدم بررسی شاخص‌های مولکولی مرتبط با آپوپتوز و استروئیدوژنز اشاره کرد. علاوه بر این، ارزیابی مستقیم توان باروری از طریق مطالعات جفت‌گیری انجام نشد. انجام مطالعات آینده با بررسی شاخص‌های بیوشیمیایی و مولکولی بیشتر می‌تواند به تبیین دقیق‌تر مکانیسم‌های اثر عصاره نعنای فلفلی در کاهش سمیت تولیدمثلی ناشی از MTBE کمک کند.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که مواجهه با MTBE (با دوز ۸۰۰ mg/kg/day) باعث اختلال در محور HPG، کاهش هورمون‌های تولیدمثلی، آسیب بافت بیضه و کاهش کیفیت اسپرم در رت‌های نر بالغ و بیستار می‌شود که احتمالاً با افزایش استرس اکسیداتیو همراه است. از سوی دیگر، تجویز عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی، به ویژه در دوز ۲۵۰ mg/kg، توانست بسیاری از این تغییرات را به‌طور معنی‌داری بهبود بخشد. این اثرات احتمالاً از طریق خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره و تعدیل عملکرد محور HPG اعمال می‌شوند. بنابراین، عصاره هیدروآتانولی نعنای فلفلی می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب طبیعی امیدبخش برای کاهش سمیت تولیدمثلی ناشی از آلاینده‌هایی نظیر MTBE مطرح باشد، هرچند انجام مطالعات تکمیلی برای روشن شدن دقیق مکانیسم‌های مولکولی اثر آن ضروری است.

تضاد منافع: نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

سپاسگزاری

بدینوسیله از دانشگاه بوعلی سینا برای حمایت‌های مالی این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱. تشکری، م.، و عیدی، ا. (۱۳۹۸). بررسی اثر متیل ترشیاری بوتیل اتر (MTBE) روی ساختار هموگلوبین خون موش نر نژاد ویستار. *پاتوبیولوژی مقایسه‌ای/ایران*، ۱۶(۲) (پیاپی ۶۵)، ۲۸۰۷-۲۸۱۲.
۲. حیدرزاده، س.، آذربایجانی، م. ع.، متین‌همایی، ح.، و هدایتی، م. (۱۳۹۷). مروری بر گیاهان آفرودیازیک و فعالیت‌های بدنی بر غلظت تستوسترون. *گیاهان دارویی*، ۱۷ دوره دوم (۶۶)، ۱-۲۶.
۳. دابی، ح. ر.، دریابگی زند، ع.، مهدوی، ب.، کوشافر، م.، و چمنی، م. (۱۳۹۴). اثرات متیل-ترت-بوتیل اتر (MTBE) بر روند تولیدمثل موش سوری ماده. *پژوهش‌های جانوری (زیست‌شناسی ایران)*، ۲۸(۳)، ۳۲۳-۳۳۱.
۴. زارع، ک.، و نعیمی، ن. (۱۳۹۶). بررسی اثرات متیل ترشیو بوتیل اتر (MTBE) بر برخی پارامترهای خون و کبد. *مجله علوم پزشکی دانشگاه مازندران*، ۲۷(۱۴۹)، ۴۹-۶۲.
۵. سیف‌سهندی، م.، مهرآفرین، ع.، خلیقی‌سیگارودی، ف.، شریفی، م.، و نقدی‌بادی، ح. (۱۳۹۷). مروری بر خصوصیات آناتومیک، فیتوشیمیایی و فارماکولوژیکی گیاه دارویی نعنای فلفلی (*Mentha piperita* L.). *گیاهان دارویی*، ۱۸(۶۹)، ۱۶-۳۳.
۶. قربانی رنجبری، ع.، قربانی رنجبری، ن.، قربانی رنجبری، ز.، و قربانی رنجبری، س. (۱۳۹۳). بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی گزنه بر تغییرات هورمون تستوسترون و اسپرماتوزن در موش صحرایی. *تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی*، ۴(۱۴)، ۳۹-۳۱.
۷. نیک‌پی، ا.، مرتضوی، ب.، اصلیلان مهابادی، ح.، خوانین، ع.، رضایی، ع.، سلیمانان، ا.، و کاظمیان، ح. (۱۳۸۴). آبکافت کاتالاستی متیل ترت بوتیل اتر (MTBE) در آب‌های زیرزمینی. *شیمی و مهندسی شیمی/ایران*، ۲۴(۱)، ۷۳-۸۱.
۸. یزدانی، م.، جوکارکاشی، ف.، و دشتی زاده، ز. (۱۳۹۸). بررسی فعالیت ضد میکروبی و ضد اکسیدانی عصاره گیاه نعنای فلفلی. *مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران*، ۱۳(۳)، ۲۱۹-۲۱۰.
9. Almeida, L., Pascale, C., & Hall, E. (2004). The effects of methyl tertiary-butyl ether on mouse testis. *The Toxicologist*, 78(S-1), 188.
10. Ansari-Lari, M., & Tanideh, N. (2009). Changes in sex hormones and offspring sex ratio following gasoline exposure in male rats. *Comparative Clinical Pathology*, 18, 43-45.

11. Arbabi, M., Sadeghi, M., Nikpey, A., & Mardani, G. (2009). Aerobic biodegradation of pre-treated methyl tert-butyl ether by ozonation in an upflow fixed-bed reactor. *Journal of Environmental Science*, 5(3), 304-310.
12. Arruda, M. O., Mendes, S. J. F., Teixeira, S. A., de Mesquita, L. S. S., de Sousa Ribeiro, M. N., Galvão, S. S. L., ... & de Sousa Ribeiro, M. N. (2017). The hydroalcoholic extract obtained from *Mentha piperita* L. leaves attenuates oxidative stress and improves survival in lipopolysaccharide-treated macrophages. *Journal of Immunology Research*, 2017:2078794.
13. Asadi, M. H., Zafari, F., Sarveazad, A., Abbasi, M., Safa, M., Koruji, M., & Miran, R. A. (2014). Saffron improves epididymal sperm parameters in rats exposed to cadmium. *Nephro-Urology Monthly*, 6(1), e14125.
14. Belpoggi, F., Soffritti, M., & Maltoni, C. (1995). Methyl tertiary-butyl ether (MTBE)—a gasoline additive—causes testicular and lymphohaematopoietic cancers in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 11, 119-149.
15. Billitti, J. E., Faulkner, B. C., & Wilson, B. W. (1999). Acute testicular toxicity of MTBE and breakdown products in lab mice. *The Toxicologist*, 48 (Abstract #1255).
16. Bird, M. G., Burleigh-Flayer, H. D., Chun, J. S., Douglas, J. F., Kneiss, J. J., & Andrews, L. S. (1997). Oncogenicity studies of inhaled methyl tertiary-butyl ether (MTBE) in CD-1 mice and F-344 rats. *Journal of Applied Toxicology*, 17(S1), S45-S55.
17. Cheng, Y., Gulbins, E., & Siemen, D. (2011). Activation of the permeability transition pore by Bax via inhibition of the mitochondrial BK channel. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 27, 191-200.
18. Darwish, I. A. E., & Mosallam, S. A. E. (2019). Chromosome aberrations in bone marrow cells of rats treated with MTBE. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(1), 89-93.
19. Day, K. J., de Peyster, A., Allgaier, B. S., Luong, A., & MacGregor, J. A. (1998). Methyl t-butyl ether (MTBE) effects on the male rat reproductive endocrine axis. *The Toxicologist*, 42(1S), 174.
20. de Peyster, A., MacLean, K. J., Stephens, B. A., Ahern, L. D., Westover, C. M., & Rozenshteyn, D. (2003). Subchronic studies in Sprague-Dawley rats to investigate mechanisms of MTBE-induced Leydig cell cancer. *Toxicological Sciences*, 72, 31-42.
21. de Peyster, A., Rodriguez, Y., Shuto, R., Goldberg, B., Gonzales, F., Pu, X., & Klaunig, J. E. (2008). Effect of oral methyl-t-butyl ether (MTBE) on the male mouse reproductive tract and oxidative stress in liver. *Reproductive Toxicology*, 26(3-4), 246-253.
22. Dong-mei, L., Yi, G., Chun-Tao, Y., Yu-feng, H., & Xiao-dong, H. (2009). Effects of subchronic methyl tert-butyl ether exposure on male Sprague-Dawley rats. *Toxicology and Industrial Health*, 25(1), 15-23.
23. Donna, W. H., Spears, C. P., Prakash, S., George, A., Olah, B., Tatyana, S., et al. (1999). Mutagenicity studies of methyl-tert-butyl ether using the Ames tester strain TA102. *Mutation Research*, 446, 15-21.
24. Hong, J. Y., Wang, Y. Y., Bondoc, F. Y., Yang, C. S., Lee, M., & Huang, W. Q. (1997). Rat olfactory mucosa displays a high activity in metabolizing methyl tert-butyl ether and other gasoline ethers. *Fundamental and Applied Toxicology*, 40(2), 205-210.
25. Kaur, J., & Kaur, K. (2023). Peppermint essential oil. In G. A. Nayik & M. J. Ansari (Eds.), *Essential oils: Extraction, characterization and applications* (pp. 103-120). Elsevier Academic Press.
26. Khalili, L., Gholami, S., & Ansari-Lari, M. (2015). Evaluation of offspring sex ratio, sex hormones and antioxidant enzymes following exposure to methyl tertiary butyl ether in adult male Sprague-Dawley rats. *EXCLI Journal*, 14, 75-82.
27. Li, D., Chuntao, Y., Gong, Y., Huang, Y., & Han, X. (2008). The effects of methyl tert-butyl ether (MTBE) on the male rat reproductive system. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), 2402-2408.
28. Li, D., Liu, Q., Gong, Y., Huang, Y., & Han, X. (2009). Cytotoxicity and oxidative stress study in cultured rat Sertoli cells with methyl tert-butyl ether (MTBE) exposure. *Reproductive Toxicology*, 27(2), 170-176.
29. Li, D., Yin, D., & Han, X. (2007). Methyl tert-butyl ether (MTBE)-induced cytotoxicity and oxidative stress in isolated rat spermatogenic cells. *Journal of Applied Toxicology*, 27(1), 10-17.
30. Li, D. M., & Han, X. D. (2006). Evaluation of toxicity of methyl tert-butyl ether (MTBE) on mouse spermatogenic cells in vitro. *Toxicology and Industrial Health*, 22(7), 291-299.
31. Lucio, R. A., Tlachi-López, J. L., Eguibar, J. R., & Ágmo, A. (2013). Sperm count and sperm motility decrease in old rats. *Physiology & Behavior*, 110-111, 73-79.
32. Mehlman, M. A. (1995). Dangerous and cancer-causing properties of products and chemicals in the oil refining and petrochemical industry: Part XV. Health hazards and health risks from oxygenated automobile fuels (MTBE): Lessons not heeded. *International Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 4(2), 219-236.
33. Miller, M. J., Ferdinandi, E. S., Klan, M., Andrews, L. S., Douglas, J. F., & Kneiss, J. J. (1997). Pharmacokinetics and disposition of methyl t-butyl ether in Fischer-344 rats. *Journal of Applied Toxicology*, 17(S1), S3-S12.

34. Najdegerami, I. H., Maghami, P., SheikhHasani, V., Hosseinzadeh, G., Sheibani, N., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2017). Antichaperone activity and heme degradation effect of methyl tert-butyl ether (MTBE) on normal and diabetic hemoglobins. *Journal of Molecular Recognition*, 30(5), e2603.
35. Naveen, K. L., Bhattacharjee, A., & Hegde, K. (2023). A study to evaluate the neuroprotective property of aqueous extract of *Mentha piperita* leaves on haloperidol induced Parkinsonism in experimental rats. *Asian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(3), 139-144.
36. Parham, S., Kharazi, A. Z., Bakhsheshi-Rad, H. R., Nur, H., Ismail, A. F., Sharif, S., RamaKrishna, S., & Berto, F. (2020). Antioxidant, Antimicrobial and Antiviral Properties of Herbal Materials. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(12), 1309.
37. Pirsaeheb, M., Dargahi, A., Khamutian, R., Asadi, F., & Atafar, Z. (2014). A survey of methyl tertiary butyl ether concentration in water resources and its control procedures. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 24(113), 119-128.
38. Prah, J., Ashley, D., Blount, B., Case, M., Leavens, T., Pleil, J., & Cardinali, F. (2004). Dermal, oral, and inhalation pharmacokinetics of methyl tertiary butyl ether (MTBE) in human volunteers. *Toxicological Sciences*, 77(2), 195-205.
39. Sgambato, A., Iavicoli, I., De Paola, B., Bianchino, G., Boninsegna, A., Bergamaschi, A., ... & Galati, R. (2009). Differential toxic effects of methyl tertiary butyl ether and tert-butanol on rat fibroblasts in vitro. *Toxicology and Industrial Health*, 25(2), 141-151.
40. Suvarna, K. S., Layton, C., & Bancroft, J. D. (Eds.). (2019). *Bancroft's theory and practice of histological techniques* (8th ed.). Elsevier.
41. Sharpe, R. M. (1988). Endocrinology and paracrinology of the testis. In J. C. Lamb, IV & P. M. D. Foster (Eds.), *Physiology and toxicology of male reproduction* (pp. 71-102). Academic Press.
42. Valipour, M., Maghami, P., Habibi-Rezaei, M., Sadeghpour, M., Khademian, M. A., Mosavi, K., Ahmad, F., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2017). Counteraction of the deleterious effects of reactive oxygen species on hemoglobin structure and function by ellagic acid. *Journal of Luminescence*, 182, 1-7.
43. Williams, T. M., Cattley, R. C., & Borghoff, S. J. (2000). Alterations in endocrine responses in male Sprague-Dawley rats following oral administration of methyl tert-butyl ether. *Toxicological Sciences*, 54, 168-176.
44. Wu, Z., Tan, B., Liu, Y., Dunn, J., Martorell Guerola, P., Tortajada, M., Cao, Z., & Ji, P. (2019). Chemical composition and antioxidant properties of essential oils from peppermint, native spearmint and Scotch spearmint. *Molecules*, 24(15), 2825.
45. Zhu, Q., Zhu, S., Li, Q., Wang, Y., Zheng, D., Chen, C., Ruan, N., Chen, H., Yan, H., Lin, H., & Ge, R. S. (2022). Methyl tert-butyl ether inhibits pubertal development of Leydig cells in male rats by inducing mitophagy and apoptosis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 232, 113282.
- Bus, J. S., Gollapudi, B. B., & Hard, G. C. (2022). Methyl-tert-butyl ether (MTBE): integration of rat and mouse carcinogenicity data with mode of action and human and rodent bioassay dosimetry and toxicokinetics indicates MTBE is not a plausible human carcinogen. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 25(4), 135-161.
- Hudz, N., Kobylinska, L., Pokajewicz, K., Horčinová Sedláčková, V., Fedin, R., Voloshyn, M., ... & Lipok, J. (2023). *Mentha piperita*: Essential oil and extracts, their biological activities, and perspectives on the development of new medicinal and cosmetic products. *Molecules*, 28(21), 7444.
- Mahendran, G., & Rahman, L. U. (2020). Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological updates on Peppermint (*Mentha× piperita* L.)—A review. *Phytotherapy research*, 34(9), 2088-2139.

Evaluation of the Ameliorative Effects of Hydroethanolic Extract of Peppermint on Methyl tert-Butyl Ether-Induced Reproductive Toxicity in Male Wistar Rats

Taheri Kamalan S. and Roohi Aminjan A. *

Dept. of Biology, Faculty of Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

*Corresponding Author Email: aminjan1ster@gmail.com

Abstract

Methyl tert-butyl ether (MTBE) is a persistent environmental pollutant that may induce reproductive toxicity through oxidative stress. Peppermint (*Mentha piperita* L.) possesses potent antioxidant properties and has the potential to alleviate chemically induced tissue damage. The present study was conducted to investigate the ameliorative effects of hydroethanolic extract of peppermint on MTBE-induced reproductive disorders in adult male Wistar rats. In this experimental study, twenty-eight adult male Wistar rats were randomly assigned into four groups (n = 7 each): control, MTBE, low-dose peppermint extract, and high-dose peppermint extract. Animals were first exposed to MTBE for 24 days and subsequently treated with the hydroethanolic extract of peppermint for 24 days. At the end of the experiment, serum levels of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), and testosterone, sperm parameters, malondialdehyde (MDA) levels, and histopathological alterations of the testes were evaluated. MTBE administration significantly decreased serum FSH, LH, and testosterone levels, sperm count and viability, while increasing the percentage of abnormal spermatozoa and MDA levels. Moreover, MTBE induced pathological alterations in testicular tissue, including vacuolization of Sertoli cells and reduced Leydig cell density compared with the control group. Treatment with the hydroethanolic extract of peppermint, particularly at a dose of 250 mg/kg, significantly improved hormonal, sperm, and histological parameters and reduced MDA levels compared with the MTBE group. The ameliorative effects of the extract were dose-dependent and were more pronounced at the higher dose. Based on the findings of the present study, the hydroethanolic extract of peppermint may improve reproductive parameters through its antioxidant properties and attenuation of MTBE-induced oxidative damage and could be considered a promising natural agent for mitigating MTBE-induced reproductive toxicity.

Key words: LH, FSH, Testosterone, Sperm parameters, Malondialdehyde (MDA)