اثر حفاظتی عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب (سراتونیا سیلیکوا) بر بافت بیضه در موش‌های صحرایی بالغ تیمار شده با دوکسوروبیسین

هنگامه مهدی خانی[۱]، مهرداد شریعتی[۲*]، محسن فروزانفر[۳]، سید ابراهیم حسینی[۴]

[۱] دانشجوی دکتری زیست‌شناسی تکوینی، گروه بیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
[۲] دانشیار ،گروه بیولوژی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران
[۳] استادیار،گروه بیولوژی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت ، ایران
[۴] دانشیار ،گروه بیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز ، ایران

تاریخ دریافت مقاله:۹۸/۵/۶ ؛ تاریخ پذیرش:۹۹/٤/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: دوکسوروبیسین یکی از پرمصرف‌ترین داروهای ضد سرطان بشمار می‌رود. هدف از این مطالعه بررسی اثر حفاظتی عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب بر بافت بیضه در موش‌های صحرایی بالغ تیمار شده با دوکسوروبیسین است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از ٥٦ موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار در ۷ گروه ۸ تایی استفاده شد. گروه کنترل فقط آب و مواد غذایی معمولی دریافت کردند. گروه شم آب مقطر به میزان ۳ mg/kg به روش تزریق درون صفاقی دریافت کردند. گروه شاهد۱ فقط داروی دوکسوروبیسین دوز ۳ mg/kg یک‌بار در هفته به مدت ٤ هفته به روش تزریق درون صفاقی دریافت کردند.گروه شاهد۲میزان حداکثر دوز (٦۰۰ mg/kg) از عصاره هیدرو الکلی خرنوب به مدت ٤۸ روز به‌صورت گاواژ دریافت کرد و گروه‌های تجربی۱، ۲ و ۳ داروی دوکسوروبیسین به میزان ۳mg/kg یک‌بار در هفته به مدت ٤ هفته به‌صورت تزریق درون صفاقی و به ترتیب ٦۰۰ mg/kg و۳۰۰و۱۵۰ عصاره هیدرو الکلی خرنوب را به مدت ٤۸ روز به‌صورت گاواژ دریافت کردند. جهت بررسی بافت بیضه از روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین استفاده شد.

نتایج: میانگین وزن بدن، تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی ، تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت ، تعداد سلول‌های اسپرماتید و تعداد سلول‌های لایدیگ در گروه تجربی دریافت‌کننده دوکسوروبیسین و دوز۳۰۰ mg/kg عصاره هیدرو الکلی خرنوب در مقایسه با گروه دریافت‌کننده دوکسوروبیسین افزایش معنی‌دار نشان داد. در گروه‌های تجربی دریافت‌کننده دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوزهای ٦۰۰ mg/kg و۱۵۰میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و لایدیگ کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه‌های کنترل و شم نشان دادند ($P<0.05$). همچنین مطالعات بافت‌شناسی نشان داد که میزان چروکیدگی بافت بیضه در گروه تجربی دریافت‌کننده دوکسوروبیسین و دوز ۳۰۰ mg/kg عصاره هیدرو الکلی خرنوب در مقایسه با گروه دریافت‌کننده دوکسوروبیسین کاهش بیشتری مشاهده گردیده است که نشانگر تأثیر این دوز در بازسازی بافت بیضه است.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که عصاره هیدرو الکلی خرنوب در دوز۳۰۰ mg/kg دارای اثر حفاظتی بر مسمومیت اسپرماتوزنز القا شده توسط داروی دوکسوربیسین می‌باشد.

کلمات کلیدی: خرنوب، دوکسوروبیسین ،بیضه، موش صحرایی

نویسنده مسئول:
دانشیار ،گروه بیولوژی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

۰۹۱۷۳۱۳۳۲۲۱
E-mail: mehrdadshariati@hotmail.com

مقدمه

عوامل مختلفی بر تولید اسپرم تأثیر گذاشته و منجر به بروز ناباروری می‌شوند. این عوامل در حال حاضر داروهای ضد سرطان، آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد سمی و آفت‌کش‌ها، تابش، استرس، کمبود ویتامین و آلودگی هوا می‌باشند که می‌توانند تعداد اسپرم را توسط القای رادیکال‌های آزاد و اکسیداسیون اپی‌تلیوم ژرمینال در بافت بیضه کاهش دهند[۱].

دوکسوربیسین دارویی آنتراسیکلیک است که بیشتر برای تومورهای جامد تجویز می‌شود و دارای اثرات زیان‌بار بر باروری است[۲]. دوکسوروبیسین تا حد زیادی در درمان سرطان در کودکان استفاده می‌شود و برای سلول‌ها بسیار تهاجمی است. دوکسوروبیسین در موش نابالغ باعث صدمه به اسپرماتوگونی و خسارات غیرقابل برگشتی به اسپرماتوژنز در بزرگسالان می‌گردد. دوکسوروبیسین منجر به آسیب‌هایی گسترده مانند کاهش اسپرماتوگونی، ماکولا و یا در اوایل مرحله اسپرمیوژنز در اسپرماتیدها، در اپیتلیوم زاینده، اپیدیدیم، کاهش تعداد اسپرم و کاهش تحرک اسپرم می‌گردد[۳].

خرنوب بانام علمی *Ceratonia siliqua* گیاهی متعلق به خانواده *Fabaceae*است. خرنوب بومی مناطق مدیترانه می‌باشد و در جنوب سوریه، هند و در بسیاری از مناطق شرق مدیترانه همچنین در کالیفرنیا یافت می‌شود و در منطقه شاپور کازرون در استان فارس در ایران نیز رشد می‌کند[۴].

غلاف خرنوب یک منبع از کربوهیدرات‌های غیر سازه‌ای است(حدود ۴۵٪) و این قند بیشتر از ساکارز تشکیل‌شده است. به همین دلیل غنی از انرژی و همچنین بسیار خوش‌طعم است. غلاف خرنوب حاوی لگنین [۴]، منبع کمی از پروتئین (حدود ۵٪)، مقادیرکم چربی و لیزین و غنی از اسیدهای چرب لینولئیک و اولئیک است[۴]. از برگ‌ها و غلاف خرنوب گالیک اسید و ترکیبات فنولی جداشده‌اند[۵]. از عصاره خرنوب برخی ترکیبات ازجمله لوپئول، جنیستین و لیکورتیجنین جداشده است[۶]. سلول‌های بنیادی دانه خرنوب حاوی اسیدهای چرب ازجمله میرستیک اسید، پالمتیک اسید، اولئیک اسید، لینولئیک اسید، آراشیدونیک اسید و گالدوئیک اسید است[۷].

در مطالعه الزوبی و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان داده شد که گیاه خرنوب از نقص حافظه‌ای کوتاه‌مدت القا شده توسط استرس مزمن در موش صحرایی جلوگیری می‌کند[۸].

میوه خرنوب سطح گلوکز و کلسترول سرم را کاهش می‌دهد[۹]. در مطالعه قاسم و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان داده شد که دوزهای بالای خرنوب دارای فعالیت ضد افزایش قند خون بر مدل موش صحرایی دیابتی القا شده توسط استروپتوزوتوسین- نیکوتین آمید می‌باشد[۱۰].

در مطالعه ال-الایان و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان داده شد که عصاره غلاف گیاه خرنوب استرس اکسیداتیو و فیبروز کبدی القاشده توسط شیستوزوما مانسونی را تصحیح می‌کند[۱۱]. همچنین در مطالعه رطیبی و همکاران در سال ۲۰۱۵ مشخص گردید که خرنوب بازجذب روده‌ای گلوکز را مهار می‌کند و تحمل گلوکز را بهبود می‌بخشد. خرنوب موش‌های صحرایی را علیه دیابت‌های القاشده توسط آلوکسان محافظت می‌کند[۱۲].

علاوه براین در مطالعه لاکاب و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان داده شد که استفاده از خرنوب دارای اثرات غیرقابل انکاری در درمان بیماریهای مخرب عصبی است [۱۳]. در مطالعه رطیبی و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داده شد که عصاره خرنوب دارای اثرات حفاظتی گوارشی قوی بر علیه استرس اکسیداتیو القاشده توسط اتانول در موش‌های صحرایی می‌باشد که بخشی از آن به خواص آنتی اکسیدانتی آن مربوط می‌باشد[۱۴].

همچنین در مطالعه سویل و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داده شد که عصاره آبی خرنوب می‌تواند دارای اثرات محفاظتی کبدی مفیدی برعلیه استرس اکسیداتیو القا شده توسط اتانول حاد در موش‌های صحرایی می‌باشد[۱۵]. علاوه براین در مطالعه آگراوال و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داده شد که عصاره میوه خرنوب دارای فعالیت ضد افسردگی واسطه شده بوسیله نورآدرنالین و دوپامین می‌باشد[۱۶].

در مطالعه آتا و همکاران در سال ۲۰۱۸ مشخص گردید که عصاره میوه خرنوب می‌تواند اثرات مفیدی بر غلظت اسپرم در خرگوشها داشته باشد[۱۷]. در مطالعه مهدیانی و همکاران در سال ۲۰۱۸ مشخص گردید که در گروههای دریافت‌کننده خرنوب

غلظت وتحرک اسپرم افزایش و استرس اکسیداتیو و عوامل التهابی کاهش پیدا کرد[۱۸].

با توجه به خواص آنتی اکسیدانی گیاه خرنوب در این تحقیق به بررسی اثر حفاظتی عصاره هیدرو الکلی میوه و غلاف خرنوب بر تغییرات بافتی بیضه موش‌های صحرایی تحت تیمار با دوکسوربیسین (داروی شیمی درمانی) پرداخته شده است تا در صورت موثر بودن به عنوان مکمل غذائی - داروئی برای کاهش عوارض جانبی ناشی از داروهای شیمی درمانی ازجمله دوکسوربیسین بر اسپرماتوژنز در مردان مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و استخراج عصاره هیدرو الکلی خرنوب

میوه خرنوب از ترکیه تهیه شد. ابتدا میوه گیاه خشک خرنوب را به صورت پودر در آورده و بعد ۱۰۰گرم از پودر مورد نظر را با ۵۰۰ سی سی اتانول ۷۰ درصد به مدت ۷۲ ساعت در دستگاه پرکولاتور ریخته و پس از گذشت زمان مورد نظر محلول حاوی عصاره از تفاله‌های آن جدا شد. سپس محلول را در دستگاه روتاری قرار داده تا حلال از آن جدا شود. در این حالت محلول عسلی مانند ایجاد شد که آن را در یک دسیکاتور متصل به پمپ خلا قرار داده تا کاملا خشک شود. سپس دوزهای مورد نظر عصاره را با حل کردن همان مقدار گرم پودر خشک گیاه خرنوب (۶۰۰ و ۳۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم) در یک سی سی نرمال سالین تهیه گردید و با توجه به وزن حیوان تجویز انجام شد [۱۹و۲۰].

حیوانات

در این مطالعه تجربی از ۵۶ سر موش صحرایی بالغ نر نژاد ویستار ۲/۵تا ۳ ماهه با وزن تقریبی ۱۰± ۲۱۰ گرم استفاده شد. حیوانات بطور تصادفی در ۷ گروه ۸ تایی تا زمان انجام آزمایش در قفسهای استاندارد و تحت شرایط یکسان با دمای ۲۲-۲۰درجه سانتیگراد و با چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و۱۲ساعت تاریکی نگه داری شدند. آب و غذای کافی در اختیار آنها قرارگرفت و ملاحظات اخلاقی در مورد حیوانات رعایت شد.

تیمار حیوانات

حیوانات به ۷ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل فقط آب و مواد غذایی معمولی دریافت کردند. گروه شم آب مقطر به میزان ۳ mg/kg به روش تزریق درون صفاقی دریافت کردند. گروه شاهد۱ که فقط داروی دوکسوروبیسین (DOX) را با دوز ۳ mg/kg یک‌بار در هفته به مدت ٤ هفته به روش درون صفاقی دریافت کردند.گروه شاهد۲میزان حداکثر دوز (۶۰۰ mg/kg) عصاره هیدرو الکلی خرنوب به مدت ٤٨ روز به‌صورت گاواژ دریافت کرد. گروه تجربی۱ داروی دوکسوروبیسین به میزان ۳mg/kg یک‌بار در هفته به مدت ٤ هفته به‌صورت درون صفاقی و (۱۵۰mg/kg) عصاره هیدرو الکلی خرنوب را به مدت ٤٨ روز به‌صورت گاواژ دریافت کردند. گروه تجربی۲ داروی دوکسوروبیسین به میزان ۳mg/kg یک‌بار در هفته به مدت ٤ هفته به‌صورت درون صفاقی و (۳۰۰mg/kg) عصاره هیدرو الکلی خرنوب را به مدت ٤٨ روز به‌صورت گاواژ دریافت کردند. گروه تجربی۳ داروی دوکسوروبیسین به میزان ۳mg/kg یک‌بار در هفته به مدت ٤ هفته به‌صورت درون صفاقی و (۶۰۰mg/kg) عصاره هیدرو الکلی خرنوب را به مدت ٤٨ روز به‌صورت گاواژ دریافت کردند. شروع تجویز عصاره خرنوب و داروی دوکسوروبیسین در تمام گروه های مورد آزمایش بطور همزمان بود. انتخاب دوزهای تزریقی عصاره خرنوب [۲۱] و مدت زمان تجویز[۲۲] و دوز داروی دوکسوروبیسین (DOX) [۲۳] با استفاده از مطالعات قبلی صورت گرفت.

مطالعات بافتی بیضه

پس از پایان یافتن دوره تیمار حیوانات تحت تأثیر بیهوشی با کتامین و زایلازین قرار گرفتند. پس ازکالبدگشایی حیوانات بیضه‌های چپ وراست آنها برداشته شد.در مرحله تثبیت بافتها درفرمالین بافرخنثی۱۰درصدتثبیت گردیدند.مرحله آبگیری به کمک الکل با غلظت‌های متفاوت (از کم به زیاد)صورت گرفت . مرحله شفاف سازی با قرار دادن بافت‌ها در دو ظرف حاوی زایلین صورت گرفت. درمرحله جایگزینی بافتها در سه ظرف حاوی پارافین مذاب (٦٥ درجه سانتی گراد) هر کدام یک ساعت قرار داده شدند.در مرحله قالب گیری از قطعات سالو کهارت استفاده شد.

درمرحله مقطع گیری مقاطع بافتی به ضخامت٤-٥ میکرون بریده شدودرمرحله رنگ‌آمیزی از رنگ هماتوکسیلن- ائوزین استفاده گردید.تمام مطالعات بافتی زیرنظرپاتولوژیست صورت گرفت.

به منظور شمارش سلولها از هر گروه ٤٠ مقطع عرضی لوله اسپرم ساز مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت. از هر اسلاید حداقل ٥ لوله اسپرم ساز انتخاب و پس از شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید، سلول‌های سرتولی و لایدیگ شمارش و میانگین گرفته شد و نتایج آماری مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز آماری

مقادیر بدست آمده از پارامترهای بافتی در گروه‌های کنترل،شم،شاهد ۱و۲ و گروه‌های تجربی (گروه‌های دریافت‌کننده دوزmg/kg۱۵۰، ۳۰۰ و٦٠٠ عصاره هیدرو الکلی خرنوب) با نرم افزار SPSS وژن ۲۲و از طریق آزمون ANOVA و تست توکی به طور جداگانه آنالیز و با یکدیگر مقایسه شدند و سطح (P<0.05) مرز استنتاج آماری در نظر گرفته شد. داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای انحراف معیار ارائه شد.

نتایج

میانگین وزن بدن در گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ نسبت به گروه کنترل وشم کاهش معنی‌داری را نشان داد(P<0.001) و (P<0.05). میانگین وزن بدن در گروههای تجربی ۳و ۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه کنترل و شم کاهش معنی‌داری نشان داد(P<0.001) و (P<0.01). میانگین وزن بدن در گروه تجربی ۲ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب و شاهد ۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ٦٠٠ نسبت به گروه کنترل و شم تغییر معنی‌داری نشان داد(P<0.05). میانگین وزن بدن در گروههای تجربی ۳و ۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ تغییر معنی‌داری نشان نداد. میانگین وزن بدن در گروه تجربی ۲ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ در سطح (P=0.009) افزایش معنی‌داری نشان داد. میانگین وزن بدن در گروه شاهد ۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ٦٠٠ نسبت به گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳mg/kg افزایش معنی‌داری نشان داد(P<0.05). میانگین وزن بدن در گروههای تجربی ۳و۲و۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به یکدیگر تغییر معنی‌داری نشان نداد(نمودار۱).

میانگین تعداد سلول‌های سرتولی گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ نسبت به گروه کنترل و شم کاهش معنی‌داری را نشان داد(P<0.05). میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در تمام گروههای تجربی دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب و شاهد ۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ٦٠٠ نسبت به گروه کنترل و شم تغییر معنی‌داری نشان نداد. میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در تمام گروههای تجربی دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ تغییر معنی‌داری نشان نداد. میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در گروههای تجربی ۳و۲و۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به یکدیگر تغییر معنی‌داری نشان نداد (نمودار۲).

میانگین تعداد سلول‌های لایدیگ در گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ نسبت به گروه کنترل وشم کاهش معنی‌داری را نشان داد(P<0.001). میانگین تعداد سلول‌های لایدیگ در گروههای تجربی ۳و ۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه کنترل و شم کاهش معنی‌داری نشان داد(P<0.001). میانگین تعداد سلول‌های لایدیگ در گروه تجربی ۲ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب و شاهد ۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ٦٠٠ نسبت به گروه کنترل و شم تغییر معنی‌داری نشان نداد(P<0.05). میانگین تعداد

سلول‌های لایدیگ در گروههای تجربی ۳و ۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ تغییر معنی‌داری نشان نداد. میانگین تعداد سلول‌های لایدیگ در گروه تجربی ۲ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ در سطح (P=0.014) افزایش معنی‌داری نشان داد. میانگین تعداد سلول‌های لایدیگ در گروه شاهد ۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ٦۰۰ نسبت به گروه گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ افزایش معنی‌داری نشان داد(P<0.05). میانگین وزن بدن در گروههای تجربی ۳و۲و۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به یکدیگر تغییر معنی‌داری نشان نداد(نمودار۳).

میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ نسبت به گروه کنترل وشم کاهش معنی‌داری را نشان داد(P<0.001)و(P<0.05). میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروههای تجربی۳و۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه کنترل و شم کاهش معنی‌داری نشان داد(P<0.001)و(P<0.01). میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه شاهد ۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ٦۰۰ نسبت به گروه کنترل و شم تغییر معنی‌داری نشان نداد. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروههای تجربی ۳و ۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ تغییر معنی‌داری نشان نداد. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه تجربی ۲ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ در سطح(P=0.046) افزایش معنی‌داری نشان داد. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه شاهد ۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ٦۰۰ نسبت به گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ افزایش معنی‌داری نشان داد(P<0.05). میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروههای تجربی ۳و۲و۱ تجربی دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به یکدیگر تغییر معنی‌داری نشان نداد(نمودار٤).

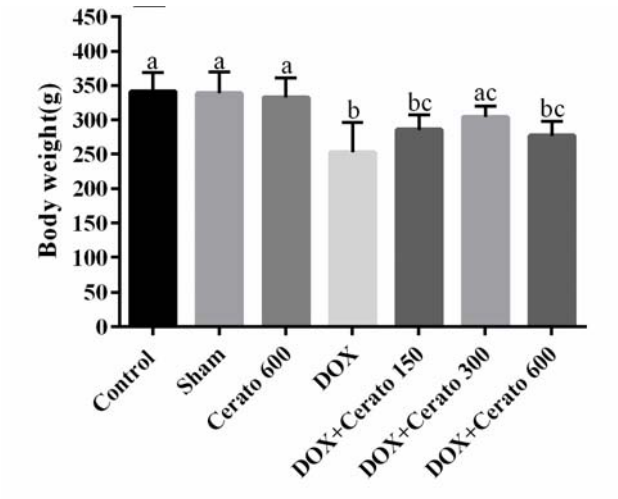
میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ نسبت به گروه کنترل وشم کاهش معنی‌داری را نشان داد(P<0.001)و(P<0.05). میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در گروههای تجربی۳و۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه کنترل و شم کاهش معنی‌داری نشان داد(P<0.05). میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در گروه شاهد ۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ٦۰۰ نسبت به گروه کنترل و شم تغییر معنی‌داری نشان نداد. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در گروههای تجربی ۳و ۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ تغییر معنی‌داری نشان نداد. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در گروه تجربی ۲ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ در سطح(P=0.025) افزایش معنی‌داری نشان داد. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در گروه شاهد ۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ٦۰۰ نسبت به گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ افزایش معنی‌داری نشان داد(P<0.05). میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در گروههای تجربی ۳و۲و۱ تجربی دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به یکدیگر تغییر معنی‌داری نشان نداد(نمودار۵).

میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ نسبت به گروه کنترل وشم کاهش معنی‌داری را نشان داد(P<0.001)و(P<0.05). میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروههای تجربی ۱و۳ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه کنترل و شم تغییر معنی‌داری نشان نداد(P<0.05). میانگین

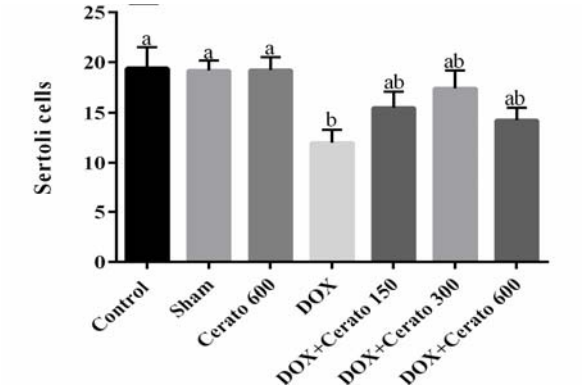
تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروه شاهد ۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۶۰۰ نسبت به گروه کنترل و شم تغییر معنی‌داری نشان نداد. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروههای تجربی ۲و۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ به ترتیب در سطح (P=0.006) و (P=0.001) افزایش معنی‌داری نشان داد. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروه شاهد ۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۶۰۰ نسبت به گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ افزایش معنی‌داری نشان داد($P<0.05$). میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروههای تجربی ۳و۲و۱ تجربی دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به یکدیگر تغییر معنی‌داری نشان نداد(نمودار۶).

مقادیر برحسب میانگین ± خطای انحراف معیار ارائه شد. در نمودار وجود حداقل یک حرف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مورد بررسی می‌باشد .اگر حرف مشابهی بین گروه‌ها وجود نداشته باشد نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ($p<0.05$) می‌باشد.

گروه کنترل: (Control). گروه شم(Sham) . گروه شاهد ۱ : دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ (DOX).



نمودار۱: مقایسه میانگین وزن بدن در گروه‌های مورد آزمایش

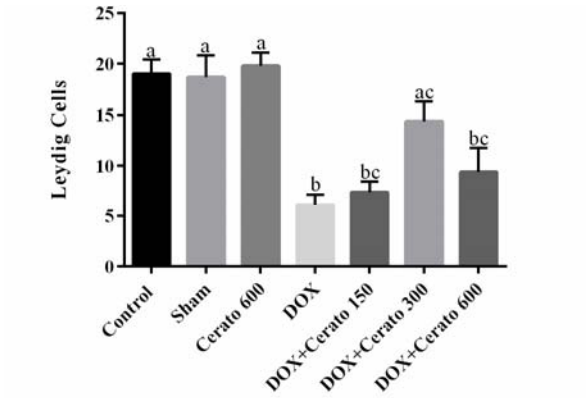


نمودار۲: مقایسه میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در گروه‌های مورد آزمایش

گروه شاهد۲ : دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۶۰۰ (cerato 600). گروه تجربی۱ : دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۱۵۰ (DOX+ cerato 150). گروه تجربی۲ : دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۳۰۰ (DOX+ cerato 300). گروه تجربی ۳ :دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۶۰۰: (DOX+ cerato 600).

مقادیر برحسب میانگین ± خطای انحراف معیار ارائه شد. در نمودار وجود حداقل یک حرف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مورد بررسی می‌باشد .اگر حرف مشابهی بین گروه‌ها وجود نداشته باشد نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ($p<0.05$) می‌باشد.

گروه کنترل: (Control). گروه شم(Sham) . گروه شاهد ۱ : دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ (DOX). گروه شاهد۲ : دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg۶۰۰ (cerato 600). گروه تجربی۱ : دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۱۵۰ (DOX+ cerato 150). گروه تجربی۲ : دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۳۰۰ (DOX+ cerato 300). گروه تجربی ۳ :دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۶۰۰: (DOX+ cerato 600).



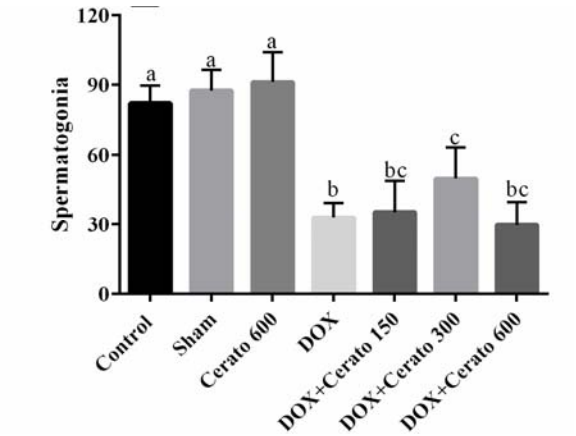
نمودار۳: مقایسه میانگین تعداد سلول‌های لایدیگ در گروه‌های مورد آزمایش

مقادیر برحسب میانگین ± خطای انحراف معیار ارائه شد. در نمودار وجود حداقل یک حرف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مورد بررسی می‌باشد .اگر حرف مشابهی بین گروه‌ها وجود نداشته باشد نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ($p<0.05$) می‌باشد.

گروه کنترل: (Control). گروه شم(Sham) . گروه شاهد ۱ : دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg (DOX). گروه شاهد۲ : دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰mg/kg (cerato 600). گروه تجربی۱ : دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۱۵۰ mg/kg (DOX+ cerato 150). گروه تجربی۲ : دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۳۰۰ mg/kg (DOX+ cerato 300). گروه تجربی ۳ :دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰: mg/kg (DOX+ cerato 600).

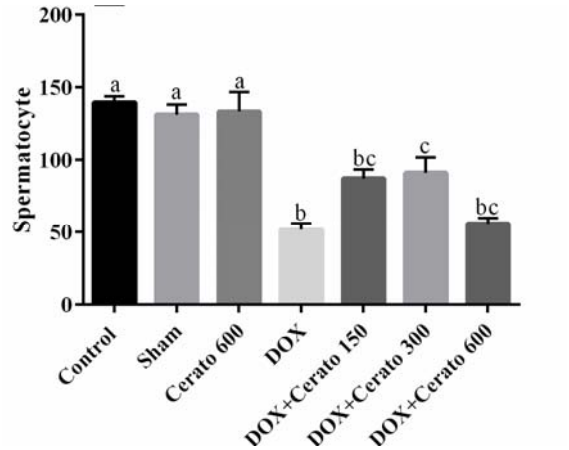
مقادیر برحسب میانگین ± خطای انحراف معیار ارائه شد. در نمودار وجود حداقل یک حرف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مورد بررسی می‌باشد .اگر حرف مشابهی بین گروه‌ها وجود نداشته باشد نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ($p<0.05$) می‌باشد.

گروه کنترل: (Control). گروه شم(Sham) . گروه شاهد ۱ : دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg (DOX).



نمودار٤: مقایسه میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه‌های مورد آزمایش

گروه شاهد۲ : دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg (cerato 600). گروه تجربی۱ : دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۱۵۰ mg/kg (DOX+ cerato 150). گروه تجربی۲ : دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۳۰۰ mg/kg (DOX+ cerato 300). گروه تجربی ۳ :دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰: mg/kg (DOX+ cerato 600).

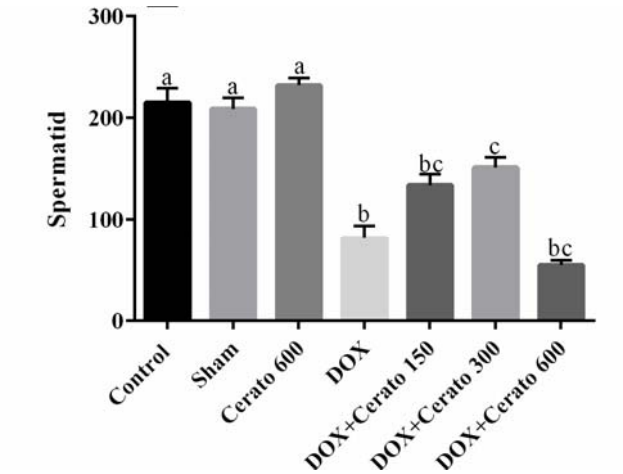


نمودار۵: مقایسه میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در گروه‌های مورد آزمایش

مقادیر برحسب میانگین ± خطای انحراف معیار ارائه شد. در نمودار وجود حداقل یک حرف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مورد بررسی می‌باشد .اگر حرف مشابهی بین گروه‌ها وجود نداشته باشد نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ($p<0.05$) می‌باشد.

گروه کنترل: (Control). گروه شم(Sham) . گروه شاهد ۱ : دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg (DOX). گروه شاهد۲ : دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰mg/kg (cerato 600). گروه تجربی۱ : دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۱۵۰ (DOX+ cerato 150). گروه تجربی۲ : دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۳۰۰ (DOX+ cerato 300). گروه تجربی ۳ :دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۶۰۰: (DOX+ cerato 600).

مقادیر برحسب میانگین ± خطای انحراف معیار ارائه شد. در نمودار وجود حداقل یک حرف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مورد بررسی می‌باشد .اگر حرف مشابهی بین گروه‌ها وجود نداشته باشد نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ($p<0.05$) می‌باشد.



نمودار۶: مقایسه میانگین میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروه‌های مورد آزمایش

گروه کنترل: (Control). گروه شم(Sham) . گروه شاهد ۱ : دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg (DOX). گروه شاهد۲ : دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰mg/kg (cerato 600). گروه تجربی۱ : دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۱۵۰ (DOX+ cerato 150). گروه تجربی۲ : دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۳۰۰ (DOX+ cerato 300). گروه تجربی ۳ :دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۶۰۰: (DOX+ cerato 600).

یافته‌های بافت‌شناسی بیضه

بررسی‌های بافت‌شناسی نشان داد که در گروههای کنترل و شم سلول های زاینده طبیعی و هیچ گونه تغییر پاتولوژیکی مشاهده نشد و لوله‌های اسپرم ساز از لحاظ ظاهری کاملا سالم بودند و تمام رده‌های سلولی اسپرماتوژنز وجود داشتند (اشکال.(A,C

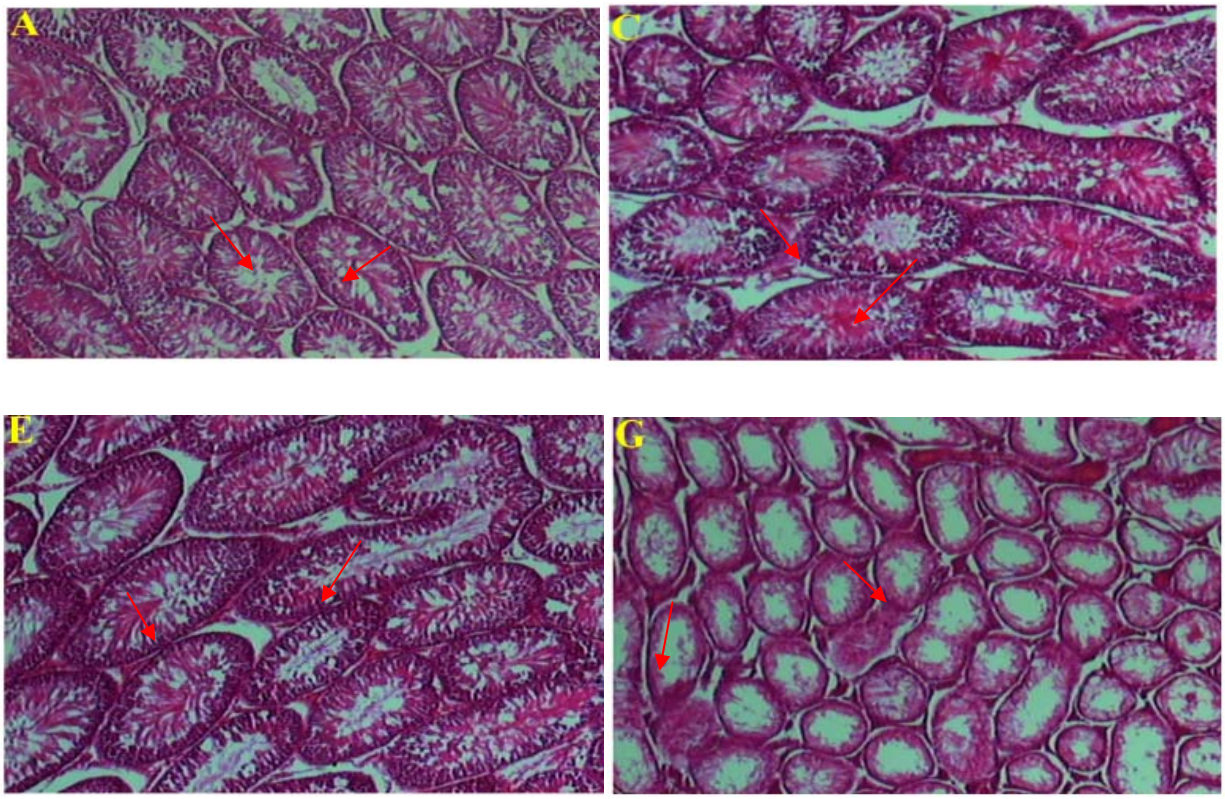
درگروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg چروکیده شدن توبول ها، از هم گسیختگی ژرمینال اپیتلیوم ، ضخیم شدن غشای پایه توبولهای اسپرم ساز، واکوئله شدن فضای درون توبول‌ها و وجود نقاط خالی داخل توبولها نشان دهنده اثرات مخرب دوکسوروبیسین بر بافت بیضه می باشد. درگروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg کاهش تمام رده‌های سلولی اسپرماتوژنز نسبت به گروه کنترل و شم مشاهده شد(شکل.(G

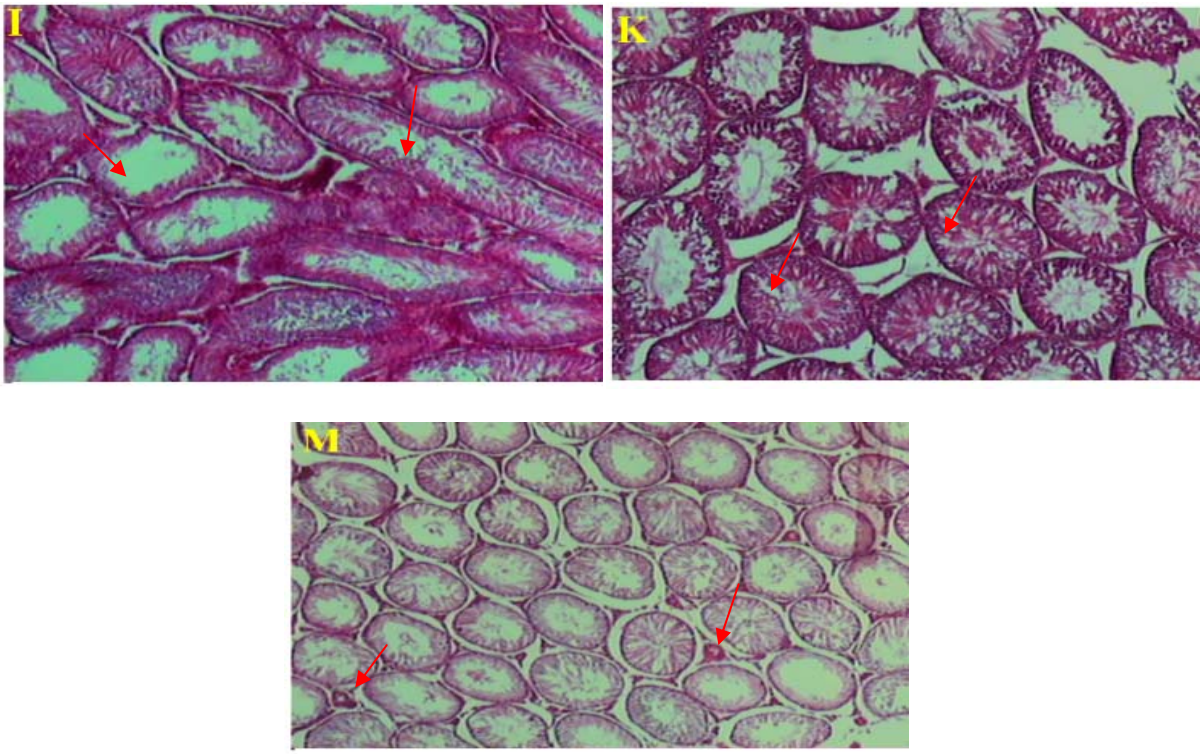
در گروه شاهد۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg همانند گروه کنترل و شم توبول و سلول های زاینده طبیعی و مملو از سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید ، اسپرماتوزوئید و لایدیگ می باشند، همچنین هیچ گونه تغییر پاتولوژیکی در بافت بیضه این گروه نسبت به گروه کنترل و شم مشاهده نگردید. در گروه شاهد۲ افزایش معنی‌دار تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید ، اسپرماتوزوئید و لایدیگ نسبت به گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین مشاهده گردید (شکل.(E

در گروه تجربی ۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدروالکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۱۵۰، کاهش معنی‌داری در تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید ، اسپرماتوزوئید و لایدیگ نسبت به گروه کنترل و شم مشاهده شد. در گروه تجربی ۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدروالکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۱۵۰، تغییر معنی‌داری در تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید ، اسپرماتوزوئید و لایدیگ نسبت به گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین مشاهده نشد(شکل I).

در گروه تجربی ۲ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی خرنوب با دوز mg/kg ۳۰۰، تغییر معنی‌داری در تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید ، اسپرماتوزوئید و لایدیگ نسبت به گروه کنترل و شم مشاهده نشد. در گروه تجربی ۲ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدروالکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۳۰۰، افزایش معنی‌داری در تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید ، اسپرماتوزوئید و لایدیگ نسبت به گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین مشاهده شد. در گروه تجربی ۲ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۳۰۰ کاهش قابل توجهی در میزان چروگیدگی بافت بیضه و تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید ، اسپرماتوزوئید و لایدیگ در مقایسه با گروههای تجربی دریافت‌کننده دوزهای دیگر عصاره مشاهده شد که نشانگر تأثیر این دوز در بازسازی بافت بیضه می‌باشد(شکل K) .

در گروه تجربی ۳ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدروالکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۶۰۰، کاهش معنی‌داری در تعداد تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید ، اسپرماتوزوئید و لایدیگ نسبت به گروه کنترل و شم مشاهده شد. در گروه تجربی ۳ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدروالکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۶۰۰، تغییر معنی‌داری در تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید ، اسپرماتوزوئید و لایدیگ نسبت به گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین مشاهده نشد (شکل M).





شکل ۱: فتومیکروگراف از برش عرضی بافت بیضه در گروههای مختلف .(رنگ‌آمیزی H&E ، بزرگنمایی × 40). A: گروه کنترل (آرایش منظم سلولها مشاهده می‌شود).C : گروه کنترل شم (آرایش منظم سلولها مشاهده می‌شود) .G: گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز mg/kg ۳ (کاهش تعداد سلول‌های زاینده نسبت به گروههای شم و کنترل). E: گروه شاهد۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ٦٠٠ (افزایش تعداد سلول‌های زاینده نسبت به گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین). I : گروه تجربی۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۱۵۰ (عدم تغییر تعداد سلول‌های زاینده نسبت به گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین). K : گروه تجربی۲ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۳۰۰ (افزایش تعداد سلول‌های زاینده نسبت به گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین). M : گروه تجربی۳ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ٦٠٠: (عدم تغییر تعداد سلول‌های زاینده نسبت به گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین).

بحث

در مطالعه حاضر میانگین وزن بدن، تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی،اسپرماتوسیت ،اسپرماتید، میانگین سلول‌های سرتولی و لایدیگ در گروه شاهد دریافت‌کننده دوکسوروبیسین mg/kg ۳ (DOX) نسبت به گروه کنترل و شم کاهش معنی‌داری نشان داد. به نظر می‌رسد که نتایج این تحقیق با مطالعات گذشته همخوانی دارد.

در یک مطالعه مشخص گردید که القای دوکسوروبیسین در دوره قبل از بلوغ در موش‌های صحرایی منجر به آسیب ریخت شناسی و عملکردی به سلول‌های سرتولی می‌گردد[۲۴]. دوکسوروبیسین مرگ سلولی را در آستر سلولی سلول‌های بنیادی در بیضه موش‌های نابالغ القا می‌کند[۲۵]. در تحقیق دیگری اثبات گردید که بعد از ۲۱و ۲۸ روز از درمان موش‌های صحرایی با دوکسوروبیسین با دوزmg/kg ۷/۵ کاهش قابل ملاحظه سلول‌های زاینده بیضه ملاحظه گردید و همچنین در دوره مطالعه کاهش ارتفاع لوله های منی ساز، قطر لوله‌های منی ساز و بخش های لوله‌های منی ساز و همچنین افزایش بخش های درون لوله ای

مشاهده گردید[۲۶].

از عملکردهای ضد تکثیری سلولی دوکسوروبیسین بر علیه سلول توموری تشکیل رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون چربی‌ها می‌باشد[۲۷]. هر دو مکانیسم، خاص سلول‌های سرطانی نمی‌باشد و می‌توانند به آسیب سلول‌های سالم نیز منجر شوند[۲۸]. چنین پروسه‌هایی در سلول بیضه افرادی که با دوکسوربیسین درمان می‌شوند نیز رخ می‌دهد. مطالعات قبلی نشان دادند که دوکسوربیسین درموش نابالغ به آسیب برگشت ناپذیری به سلول‌های سرتولی و به اختلال شدید اسپرماتوژنز منجر می‌گردد[۲۹]. دوکسوروبیسین در موش نابالغ باعث صدمه به اسپرماتوگونی، و خسارت غیرقابل برگشت، به اسپرماتوژنز در بزرگسالان ناشی از آسیب سد خونی- بیضه توسط نسل رادیکال‌های آزاد با واسطه و پراکسیداسیون اشاره می‌کند[۳۰].

به نظر می‌رسد که بهبودی در روند اسپرماتوژنز در گروه تجربی دریافت‌کننده داروی دوکسوربیسن و دوز mg/kg ۳۰۰ عصاره هیدرو الکلی خرنوب ناشی از خاصیت آنتی‌اکسیدانتی عصاره گیاه خرنوب می‌باشد. در این مطالعه افزایش وزن بدن ، تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی و همچنین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در مقایسه با گروه شاهد۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین بوضوح به چشم می‌خورد.

در گروه‌های تجربی دریافت‌کننده داروی دوکسوربیسن و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز mg/kg ۳۰۰ میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه دریافت‌کننده دوکسوروبیسین نشان داد که ارائه دهنده خواص آنتی اکسیدانی قوی[۳۱] و آنتی آپوپتوتیک [۲۱] عصاره خرنوب بر فرآیند اسپرموژنز در بافت بیضه می‌باشد. به نظر می‌رسد که نتایج این تحقیق با مطالعات گذشته همخوانی دارد.

در مطالعه مختاری و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داده شد که القای عصاره هیدروالکلی دانه خرنوب سطوح هورمونهای جنسی و تراکم اسپرم را در لوله‌های منی ساز افزایش می‌دهد[۲۱]. در مطالعه سلیمان زاده و همکاران در سال ۲۰۱۹ مشخص گردید که عصاره هیدروالکلی میوه خرنوب مسمومیت تولیدمثلی القا شده توسط سرب را در موش سوری نر تسکین می‌بخشد. در این مطالعه مشخص گردید که هم القایی عصاره هیدروالکلی میوه خرنوب و سرب بطور معنی‌داری پارامترهای اسپرم، محتوی گلوتاتیون، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی را بهبود می‌بخشد و باعث تنظیم کاهشی بیان بیضه ای ژن های i NOS,Nrf2 در مقایسه با گروه دریافت‌کننده سرب می گردد[۳۲].

در مطالعه وفایی و همکاران در سال ۲۰۱۸ مشخص گردید که القای ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره خرنوب به مدت ۳۵ روز کیفیت اسپرم، پارامترهای بیوشیمیایی، ضخامت اپیتلیوم زاینده و سطح تستوسترون را در موش‌های نابارور القا شده توسط بوسولفان بهبود می‌بخشد. در گروه های دریافت‌کننده عصاره خرنوب سطح مالون الدهید در مقایسه با گروه بوسولفان کاهش معنی‌داری نشان داد و در گروه های دریافت‌کننده عصاره خرنوب آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در مقایسه با گروه بوسولفان افزایش معنی‌داری نشان داد[۳۳].

در مطالعه فرامرزی و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان داده شد که در محیط کشت freezing/thawing مکمل شده با خرنوب کیفیت اسپرم در نمونه‌های نرموزواسپرمیا بعد از freezing/thawing بهبود یافت[۳۴].

دانه‌های خرنوب حاوی اسید گاما لینولئیک و آلفا لینولنیک اسید است که می‌تواند تبدیل به اسید چرب دی هموگاما و سپس به اسید آراشیدونیک (که پیش ساز همه پروستاگلاندین‌ها مانند تأثیر پروستاگلندین e2 می‌باشد) گردد. دانه خرنوب همچنین حاوی اسید آراشیدونیک می‌باشد که به نظر می‌رسد نقش عمده ای در بیضه از خود نشان می‌دهد[۲۱]. دانه‌های خرنوب سرشار از فیتواسترولهاست. این ترکیبات آنالوگ ساختاری کلسترول می‌باشد و توانایی جلوگیری از سرطان‌هایی مانند سرطان‌های پستان و پروستات را داراست و مصرف روزانه mg/kg ۶۰۰ و ۳۰۰ عصاره آبی- الکلی دانه خرنوب ، غلظت تستوسترون سرم را بالا می‌برد.[۲۱]

ازجمله ترکیبات موجود در عصاره خرنوب جنیستئین می‌باشد. در مطالعه ای ویرما و همکاران در سال ۲۰۱۸ مشخص گردید که جنیستئین بوسیله افزایش تشکیل لاکتات و آنزیمهای آنتی اکسیدانتی القا شده توسط انسولین اسپرماتوژنز را بهبود می‌بخشد. بنابراین جنیستئین می‌تواند سو عملکرد بیضه ای القا شده توسط دیابت نوع ۲ را در موش تصحیح کند[۳۵].

در مطالعه جلیلی و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان داده شد که

القای جنیستئین می‌تواند کیفیت اسپرماتوزوآ را افزایش داده و از اثرات جانبی القا شده توسط مورفین بر پارامترهای اسپرم پیشگیری کند[۳۶]. در مطالعه المغربی و در سال ۲۰۱٦ مشخص گردید که جنیستئین استرس اکسیداتیو و صدمه اسپرماتوژنیک القا شده توسط رپرفیوژن و ایسکمی بیضه ای را بوسیله کاهش فعالیت سیستم متالوپروتئاز ماتریکس بیضه ای تسکین می‌بخشد[۳۷].

در مطالعه چی و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داده شد که جنیستئین بطور موثری سطوح تستوسترون درون بیضه ای را کاهش می‌دهد و بازسازی اسپرماتوژنز را در موش‌های صحرایی درمان شده با داروی بوسولفان - یک داروی شیمی درمانی - تحریک می‌کند[۳۸]. در مطالعه کیم و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داده شد که جنیستئین صدمه بیضه ای القا شده توسط اشعه گاما را از طریق اثر ضد مرگ سلولی برنامه ریزی شده و بازسازی اسپرماتوژنز کاهش می‌دهد[۳۹].

ازجمله ترکیبات موجود در عصاره خرنوب گالیک اسید می‌باشد. در مطالعه مهربان و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان داده شد که گالیک اسید می‌تواند مسمومیت تولید مثلی القا شده توسط سیکلوفسفامید را در موش‌های NMRI بالغ تصحیحکند و ظرفیت آنتی اکسیدانتی بافت بیضه را افزایش دهد[٤۰].

در مطالعه مهربان و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان داده شد که گالیک اسید دارای اثرات حفاظتی بر مرگ سلولی اسپرم و لقاح در شرایط in vitro در موش‌های نر بالغ درمان شده با سیکلوفسفامید می‌باشد[٤۱].

ازجمله ترکیبات موجود در عصاره خرنوب اولئیک اسید و لینولئیک اسید ، آراشیدونیک اسید می‌باشند. در مطالعه حسین و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داده شد که اولئیک اسید و لینولئیک اسید به طور معنی‌داری تحرک و توانایی تحرک اسپرماتوزوآ را بهبود می‌بخشد. همچنین اولئیک اسید و آراشیدونیک اسید در همه دوره‌های انکوباسیون واکنش آکروزومی اسپرم را بهبود می‌بخشد[٤۲].

نتایج نشان می‌دهد که عصاره هیدروالکلی خرنوب در دوزهای ۱۵۰ mg/kg و ٦۰۰ mg/kg منجر به تغییر معنی‌داری در تعداد سلول‌های زاینده و بازسازی بافت بیضه نمی گردد ولی دوز ۳۰۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی خرنوب منجر به افزایش معنی‌دار در تعداد سلول‌های زاینده و بازسازی بافت بیضه می شود . این نتایج نشان می‌دهد که اثرات حفاظتی عصاره هیدروالکلی خرنوب وابسته به دوز نمی‌باشد و تنها دوز ۳۰۰ mg/kg عصاره هیدرو الکلی خرنوب منجربه افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌های زاینده و بازسازی بافت بیضه می‌گردد که این اثرات حفاظتی مربوط به خواص آنتی اکسیدانتی،خنثی کننده رادیکال های آزاد، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، آنیون سوپراکسید ($O2^{\circ}$)، پرواکسیدهیدروژن(H_2O_2)، رادیکال پروکسیل (ROO°)، یون هیپوکلریت (ClO°) و رادیکال بسیار فعال هیدروکسیل (OH°) می‌باشد و این دوز از عصاره هیدروالکلی خرنوب به عنوان دوز موثر در برابر سوء عملکرد بیضه ای القا شده توسط دوکسوربیسین می‌تواند بکار رود.

نتیجه‌گیری کلی

به نظر می‌رسد که عصاره هیدرو الکلی خرنوب در دوزmg/kg ۳۰۰ دارای اثر حفاظتی بر مسمومیت اسپرماتوزنز القا شده توسط داروی دوکسوربیسین می‌باشد.

References

1. Jamalan M, Ghaffari MA, Hoseinzadeh P, Hashemitabar M, Zeinali M. Human sperm quality and metal toxicants: protective effects of some flavonoids on male reproductive function. International journal of fertility & sterility 2016 Jul;10(2):215.
2. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. Pharmacogenetics and genomics 2011 Jul;21(7):440.
3. Brilhante O, Okada FK, Sasso-Cerri E, Stumpp T, Miraglia SM. Late morfofunctional alterations of the Sertoli cell caused by doxorubicin administered to prepubertal rats. Reproductive Biology and Endocrinology 2012;10(1):79.
4. Ghahreman A. Plant Systematics Cormophytes of Iran. .2 sted,Tehran: Unive Med Sci 1998: 508-510.

5. Papagiannopoulos M, Wollseifen HR, Mellenthin A, Haber B, Galensa R. Identification and quantification of polyphenols in Carob Fruits (Ceratonia siliqua L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MS n. Journal of agricultural and food chemistry 2004;52(12):3784-91.

6. Azab A. Carob (Ceratonia siliqua): Health, medicine, chemistry. European Chemical Bulletin 2017;6(10):456-69.

7. Dakia PA, Wathelet B, Paquot M. Isolation and chemical evaluation of carob (Ceratonia siliqua L.) seed germ. Food Chemistry 2007;102(4):1368-74.

8. Alzoubi KH, Alibbini S, Khabour OF, El-Elimat T, Al-zubi M, Alali FQ. Carob (Ceratonia siliqua L.) Prevents Short-Term Memory Deficit Induced by Chronic Stress in Rats. Journal of Molecular Neuroscience 2018 ; 66 (3) : 314-21.

9. Goulas V, Stylos E, Chatziathanasiadou M, Mavromoustakos T, Tzakos A. Functional components of carob fruit: Linking the chemical and biological space. International journal of molecular sciences 2016 ; 17(11):1875.

10. Qasem MA, Noordin MI, Arya A, Alsalahi A, Jayash SN. Evaluation of the glycemic effect of Ceratonia siliqua pods (Carob) on a streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rat model. PeerJ. 2018;6:e4788.

11. Al-Olayan EM, El-Khadragy MF, Alajmi RA, Othman MS, Bauomy AA, Ibrahim SR, Moneim AE. Ceratonia siliqua pod extract ameliorates Schistosoma mansoni-induced liver fibrosis and oxidative stress. BMC complementary and alternative medicine 2016;16(1):434.

12. Rtibi K, Selmi S, Grami D, Saidani K, Sebai H, Amri M, Eto B, Marzouki L. Ceratonia siliqua L.(immature carob bean) inhibits intestinal glucose absorption, improves glucose tolerance and protects against alloxan-induced diabetes in rat. Journal of the Science of Food and Agriculture 2017;97(8):2664-70.

13. Lakkab I, El Hajaji H, Lachkar N, El Bali B, Lachkar M, Ciobica A. Phytochemistry, bioactivity: suggestion of Ceratonia siliqua L. as neurodegenerative disease therapy. Journal of Complementary and Integrative Medicine 2018;15(4).

14. Rtibi K, Jabri MA, Selmi S, Souli A, Sebai H, El-Benna J, Amri M, Marzouki L. Gastroprotective effect of carob (Ceratonia siliqua L.) against ethanol-induced oxidative stress in rat. BMC complementary and alternative medicine 2015;15(1):292.

15. Souli A, Sebai H, Chehimi L, Rtibi K, Tounsi H, Boubaker S, Sakly M, El-Benna J, Amri M. Hepatoprotective effect of carob against acute ethanol-induced oxidative stress in rat. Toxicology and industrial health 2015;31(9):802-10.

16. Agrawal A, Mohan M, Kasture S, Foddis C, Frau MA, Loi MC, Maxia A. Antidepressant activity of Ceratonia siliqua L. fruit extract, a source of polyphenols. Natural product research 2011;25(4):450-6.

17. Ata A, Yildiz-Gulay O, Güngör S, Balic A, Gulay MS. The effect of carob (Ceratonia siliqua) bean extract on male New Zealand White rabbit semen. World Rabbit Science 2018;26(3):209-15.

18. Mahdiani E, Khadem Haghighian H, Javadi M, Karami AA, Kavianpour M. Effect of Carob (Ceratonia siliqua L.) oral supplementation on changes of semen parameters, oxidative stress, inflammatory biomarkers and reproductive hormones in infertile men. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences 2018;23(3):56-66.

19. Jain H, Parial SD, Jarald E, Daud AS, Ahmad S. Extraction of Ashwagandha by conventional extraction methods and evaluation of its anti-stress activity. International Journal of Green Pharmacy (IJGP) 2010;4(3) : 183-185.

20. Germano MP, D'Angelo V, Sanogo R, Morabito A, Pergolizzi S, De Pasquale R. Hepatoprotective activity of Trichilia roka on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. Journal of Pharmacy and Pharmacology 2001 ;53(11):1569-74.

21. Mokhtari M, Sharifi E, Sh A. The effects of hydro alcoholic extract of Ceratonia siliqua L. seeds on pituitary--testis hormones and spermatogenesis in rat. Advances in Environmental Biology 2012;1:2778-84.

22. Bazrafkan M, Sobhani A. Study of Spermatogenesis in Wistar Adult Rats Administrated to Long Term of Ruta Graveolens. Jentashapir Journal of Health Research 2014;5(4).

23. Zanetti SR, Maldonado EN, Aveldano MI. Doxorubicin affects testicular lipids with long-chain (C18-C22) and very long-chain (C24-C32) polyunsaturated fatty acids. Cancer research 2007;67(14):6973-80.

24. Hou MI, Chrysis D, Nurmio M, Parvinen M, Eksborg S, Söder O, Jahnukainen K. Doxorubicin induces apoptosis in germ line stem cells in the immature rat testis and amifostine cannot protect against this cytotoxicity. Cancer research 2005;65(21):9999-10005.

25. Brilhante O, Okada FK, Sasso-Cerri E, Stumpp T, Miraglia SM. Late morfofunctional alterations of the Sertoli cell caused by doxorubicin administered to prepubertal rats. Reproductive Biology and Endocrinology 2012;10(1):79.

26. Silva RC, Britto DM, de Fátima Pereira W, Brito-Melo GE, Machado CT, Pedreira MM. Effect of short-and medium-term toxicity of doxorubicin on spermatogenesis in adult Wistar rats. Reproductive biology. 2018 Jun 1;18(2):169-76.

27. Gewirtz D. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. Biochemical pharmacology 1999;57(7):727-41.

28. Kang JK, Lee YJ, No KO, Jung EY, Sung JH, Kim YB, Nam SY. Ginseng intestinal metabolite-I (GIM-I) reduces doxorubicin toxicity in the mouse testis. Reproductive Toxicology 2002;16(3):291-8.

29. Stumpp T, Freymüller E, Miraglia SM. Sertoli cell function in albino rats treated with etoposide during prepubertal phase. Histochemistry and cell biology 2006 ;126(3):353-61.

30. Vendramini V, Sasso-Cerri E, Miraglia SM. Amifostine reduces the seminiferous epithelium damage in doxorubicin-treated prepubertal rats without improving the fertility status. Reproductive Biology and Endocrinology 2010 ;8(1):3.

31. Lachkar N, Al-Sobarry M, El Hajaji H, Lamkinsi T, Lachkar M, Cherrah Y, Alaoui K. Anti-inflammatory and antioxidant effect of Ceratonia siliqua L. methanol barks extract. J. Chem. Pharm. Res. 2016;8:202-10.

32. Soleimanzadeh A, Kian M, Moradi S, Mahmoudi S. Carob (Ceratonia siliqua L.) fruit hydro-alcoholic extract alleviates reproductive toxicity of lead in male mice: Evidence on sperm parameters, sex hormones, oxidative stress biomarkers and expression of Nrf2 and iNOS. Avicenna Journal of Phytomedicine 2019 Jul 20.

33. Vafaei A, Mohammadi S, Fazel A, Soukhtanloo M, Pour AM, Beheshti F. Effects of carob (Ceratonia siliqua) on sperm quality, testicular structure, testosterone level and oxidative stress in busulfan-induced infertile mice. Pharmaceutical Sciences 2018 ;24(2):104-11.

34. Faramarzi A, Aghaz F, Golestan Jahromi M, Bakhtiari M, Khazaei M. Does supplementation of sperm freezing/thawing media with Ceratonia siliqua improve detrimental effect of cryopreservation on sperm parameters and chromatin quality in normozoospermic specimens? Cell Tissue Bank 2019 . doi: 10.1007 /s 10561-019-09779-2.

35. Verma R, Samanta R, Krishna A. Comparative Effects of Estrogen and Phytoestrogen, Genistein on Testicular Activities of Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetic Mice. Reproductive Sciences 2018 Dec 5:1933719118815576.

36. Jalili C, Ahmadi S, Roshankhah S, Salahshoor M. Effect of Genistein on reproductive parameter and serum nitric oxide levels in morphine-treated mice. International journal of reproductive biomedicine 2016 ;14(2):95.

37. Al-Maghrebi M, Renno WM. Genistein alleviates testicular ischemia and reperfusion injury-induced spermatogenic damage and oxidative stress by suppressing abnormal testicular matrix metalloproteinase system via the Notch 2/Jagged 1/Hes-1 and caspase-8 pathways. J Physiol Pharmacol. 2016 ;67(1):129-37.

38. Chi H, Chun K, Son H, Kim J, Kim G, Roh S. Effect of genistein administration on the recovery of spermatogenesis in the busulfan-treated rat testis. Clinical and experimental reproductive medicine 2013 ;40(2) :60 -6.

39. Kim JS, Heo K, Yi JM, Gong EJ, Yang K, Moon C, Kim SH. Genistein mitigates radiation-induced testicular injury. Phytotherapy research 2012 ;26(8):1119-25.

40. Mehraban Z, Ghaffari Novin M, Golmohammadi MG, Sagha M, Ziai SA, Abdollahifar MA, Nazarian H. Protective Effect of Gallic Acid on Testicular Tissue, Sperm Parameters, and DNA Fragmentation against Toxicity Induced by Cyclophosphamide in Adult NMRI Mice. Urol J. 2019 Mar 18. doi: 10.22037/uj.v0i0.4858.

41. Mehraban Z, Ghaffari Novin M, Golmohammadi MG, Sagha M, Pouriran K, Nazarian H. Protective effect of gallic acid on apoptosis of sperm and in vitro fertilization in adult male mice treated with cyclophosphamide. Journal of cellular biochemistry 2019 May 28. doi: 10.1002/jcb.28987.

42. Hossein MS, Tareq KM, Hammano KI, Tsujii H. Effect of fatty acids on boar sperm motility, viability and acrosome reaction. Reproductive medicine and biology 2007 ;6(4):235-9.

Hengameh Mehdikhani[1], Mehrdad Shariati[2]*, Mohsen Forozanfar[3], Seyed Ebrahim Hosseini[4]

[1] *Ph.D Student of Developmental Biology , Department of Biology, Shiraz Branch ,Islamic Azad University, Shiraz, Iran*
[2] *Associate Professor, Department of Biology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran*
[3] *Assistant Professor, Department of Biology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran*
[4] *Associate Professor, Department of Biology, Shiraz Branch , Islamic Azad University, Shiraz, Iran*

Protective Effect of Hydroalcoholic Extract of Carob (Ceratonia Siliqua) on Testicular Tissue in Adult Rats Treated with Doxorubicin

Received: 28 Jul. 2019 ; Accepted: 30 Jun. 2020

Abstract

Background: Doxorubicin is one of the most commonly used anticancer drugs. The purpose of this study was to investigate the protective effect of hydroalcoholic extract of Carob (Ceratonia Siliqua) on testicular tissue in adult rats treated with doxorubicin.

Materials and Methods: In this experimental study, 56 adult male Wistar rats were used in 8 groups of seven. The control group received only ordinary water and food. The sham group received distilled water at a dose of 3 mg / kg by intraperitoneal injection. The sham group 1 received dose of doxorubicin (3mg / kg) once weekly for 4 weeks intraperitoneally. The sham group 2 group received (600 mg / kg) maximum dose of hydroalcoholic extract of Carob (Ceratonia Siliqua) for 48 days by gavage method. Experimental groups 1, 2 and 3 received doxorubicin with 3 mg/kg once weekly for 4 weeks intraperitoneally and 150, 300 and 600 mg / kg of hydroalcoholic extract of Carob (Ceratonia Siliqua) for 48 days with gavage method. Hematoxylin-eosin staining method was used to test the testicular tissue.

Results: The mean body weight, number of spermatogonial cells, spermatocyte count, spermatocyte count and number of leydig cells in the experimental group receiving doxorubicin and 300 mg / kg dose of hydroalcoholic extract of Carob (Ceratonia Siliqua) increased significantly compared to the group receiving doxorubicin. In experimental groups receiving doxorubicin and 150 and 600 mg / kg doses of hydroalcoholic extracts of Carob (Ceratonia Siliqua), the mean number of spermatogonia, spermatocyte, spermatid and leydig cells decreased significantly compared to control and sham groups ($P < 0.05$). Histologic studies also showed that the amount of shrinkage in testicular tissue in the experimental group receiving doxorubicin and 300 mg / kg dose of hydroalcoholic extract of Carob (Ceratonia Siliqua) , as compared with the group receiving doxorubicin, was decreased, which indicates the effect of this dose on the recovery of testicular tissue.

Conclusion: Hydroalcoholic extract of 300 mg / kg dose of Carob (Ceratonia Siliqua) has a protective effect on spermatogenesis poisoning induced by doxorubicin.

Keywords: Carob (Ceratonia Siliqua), Doxorubicin, Testis, Rat

***Corresponding Author:**
Department of Biology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

Tel: 09173133221
E-mail: mehrdadshariati@hotmail.com