مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره نوزدهم، شماره ۱۲، آذر ۱۳۹۶، صفحه ۴۹-۴۳

# اثر عصاره هیدروالکلی کاکوتی کوهی بر آسیب های بیضه ای ناشی از دیابت شیرین در موش های صحرایی نر

ناهید بلبل حقیقی (MSc)[۱]، سحر ملزمی (MSc)[۲*]، شهربانو گلی (PhD)[۳]، حمید محمدصادقی (MSc)[۴]، محسن امینیان (MD)[۵]

۱-گروه مامایی، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود
۲-گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود
۳-مرکز تحقیقات علوم رفتاری و اجتماعی در سلامت، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود
۴-گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
۵-گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش

**دریافت: ۹۵/۱۱/۹، اصلاح: ۹۶/۱/۲۰، پذیرش: ۹۶/۶/۳۰**

## خلاصه

**سابقه و هدف:** با توجه به اینکه دیابت اثر سویی بر پدیده اسپرماتوژنز و باروری مردان دارد و دسترسی آسان و بی خطر به داروهای گیاهی برای درمان عوارض ناشی از دیابت، در این مطالعه دو اثر پیشگیری کننده و درمانی کاکوتی کوهی بر آسیب بیضه ای در موش های صحرایی نر بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار، با محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۲۰ گرم، به چهار گروه هشت تایی تقسیم گردیدند. گروه شاهد، گروه دیابتی، که از طریق تزریق درون صفاقی ۵۵mg/kg استرپتوزوتوسین دیابتی شده، گروه تجربی۱، (دیابتی+گاواژ کاکوتی کوهی با دوز ۱۰۰ mg/kg) و گروه تجربی۲ (دیابتی + گاواژ کاکوتی کوهی با دوز ۱۵۰mg/kg)، که پس از دو ماه دیابتی شدن، به مدت پنج هفته عصاره کاکوتی کوهی را به روش گاواژ دریافت کردند. در ابتدای هفته پنجم از نمونه ها خون گیری به عمل آمد و همچنین مقاطع بیضه ها مورد ارزیابی ماکروسکوپی(بیضه راست) (طول، حجم، وزن و قطر بیضه) و هیستولوژیک (بیضه چپ) (تعداد اسپرماتوژنزیس) قرار گرفت.

**یافته‌ها:** در گروه دیابتی کاهش معنی داری را در سلول های اسپرماتوگونی(۶/۱۱±۵۸/۸۲) نسبت به شاهد (۱۰/۲۰±۷۸/۱۸) ($p<۰/۰۰۱$) و کاهش معنی دار در سلولهای سرتولی(۰/۸۷±۵/۵۵) گروه دیابتی نسبت به گروه شاهد (۱/۵۷±۱۷/۳۳) مشاهده گردید($p<۰/۰۰۱$). همچنین در گروه های تجربی افزایش معنی داری در سلول های اسپرماتید در گروه تجربی دوم (۴/۸۰±۱۱۴/۸۳) نسبت به گروه تجربی اول (۳/۳۸±۱۰۰/۳۳) مشاهده گردید ($p<۰/۰۰۱$).

**نتیجه‌گیری:** یافته های مطالعه نشان داد که تجویز دراز مدت کاکوتی کوهی بر قطر و ضخامت مجاری اسپرم ساز بیضه اثر گذار است. لذا ممکن است درمان با کاکوتی کوهی باعث بهبود در فرایند اسپرماتوژنز مردان دیابتی شود.

**واژه‌های کلیدی: دیابت، انسولین، تستوسترون.**

## مقدمه

دیابت شیرین یک حالت از افزایش قند مزمن است که علت مهم بیماری‌های میکرو و ماکرواسکولار می باشد و تقریباً بر تمام سیستم های بدن تاثیر می گذارد. شواهد رو به افزایشی حاکی از افزایش استرس اکسیداتیو در افراد دیابتی به واسطه تولید بیش از حد انواع اکسیژن واکنشی ( Reactive Oxygen ROS=Spcies) و کاهش کارایی دفاع های آنتی اکسیدانی وجود دارد. فرایندی که به صورت ابتدایی شروع می شود و زمینه بیماری را فراهم می کند. در بیماری دیابت، اکسیداسیون لیپیدها، ANA و پروتئین‌ها با گذشت زمان افزایش می‌یابد. کاهش تستوسترون، تحلیل غدد ضمیمه تولید مثلی، کاهش میل جنسی و رفتارهای جنسی در افراد مبتلا به دیابت گزارش شده است. دیابت هم چنین بر اسپرماتوژنز تأثیر می گذارد. کیفیت پایین مایع سمینال در افراد دیابتی نیز گزارش شده است که شامل کاهش حرکت اسپرم، کاهش تعداد اسپرم و افزایش اسپرمهای ناهنجار است (۱). در هند سالانه حدود ۹۲ میلیون دلار صرف هزینهٔ درمان افراد مبتلا به دیابت با ناتوانی جنسی می‌شود، از آنجا که ناتوانی جنسی بقاء نسل را تحت الشعاع دارد بر طرف کردن مشکلات آن با کمک داروهای گیاهی که مورد تایید همگان بوده و حائز اهمیت می باشد (۲). در ایران ۴ تا ۵ میلیون جمعیت دیابت دارند (۳). روش‌هایی که در حال حاضر برای درمان دیابت غیر وابسته به انسولین استفاده می‌شوند، مانند تغییر رژیم غذایی و عوامل هیپوگلیسمیک خوراکی، محدودیت‌های خاص خود را دارند. کاربرد گیاهان برای درمان دیابت قندی به‌طور وسیعی به‌ویژه درکشورهای آسیای میانه رایج است. سازمان بهداشت جهانی نیز در مورد استفاده از این گیاهان در این کشورها توصیه‌هایی را ارائه

▣ این مقاله حاصل طرح به شماره ۳۴۶۵ دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد می باشد.

*مسئول مقاله: سحر ملزمی
آدرس: شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود، گروه علوم آزمایشگاهی. تلفن: ۰۲۳-۳۲۳۹۰۳۸۰
E-mail: saharmolzemi@yahoo.com

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.12.7.0 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.12.43 ]

نموده است (۳). بسیاری از گونه های گیاهی، در طب سنتی ملل مختلف به‌واسطه خواص کاهنده قند خون برای درمان دیابت قندی مورد استفاده قرار می‌گیرند. (۳). کاکوتی کوهی با نام علمی *Ziziphora clinopodioides Lam*، گیاهی است متعلق به تیره نعناعیان گونه *Ziziphora* که بخشهای هوایی آن به صورت ادویه مصرف می گردد. این گیاه در اغلب مناطق ایران می روید و دارای ۹ زیر گونه بومی در ایران است(۴).

تمام قسمت‌های این گیاه در طب سنتی مورد استفاده دارد. بسیاری از گونه‌های گیاهی هستند که در طب سنتی ملل مختلف به‌واسطهٔ خواص کاهنده قند خون برای درمان دیابت قندی مورد استفاده قرار می‌گیرند(۵).

تاثیر عصاره هیدروالکلی کاکوتی کوهی بر تعداد سلول‌های فعال بتای پانکراس در موشهای سوری دیابتی نوع یک ناشی از استرپتوزوتوسین، به نقش آنتی اکسیدانی و کاهنده قند خون این گیاه اشاره کرده اند(۵). Mahdavi و همکاران گزارش نمودند که تیمار درون صفاقی عصاره کاکوتی کوهی به مدت ۴ هفته، بطور موثری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کبد و کلیه رت‌های دیابتی‌شده توسط استرپتوزوتوسین را افزایش می‌دهد. این عصاره، مالون‌دی‌هیدرات را که یک مارکر لیپید است، به میزان قابل توجهی در رت‌های دیابتی کاهش و نیز ظرفیت آنتی‌اکسیدان توتال را در طرح غیروابسته به غلظت، افزایش می‌دهد(۵). بنابراین، عصاره کاکوتی کوهی دارای نقش محافظتی بر ضد آسیب اکسیداتیو در رت‌های دیابتی‌شده توسط استرپتوزوتوسین است بدلیل خاصیت آنتی اکسیدان گیاه اثرات مخرب دیابت را در بدن از بین می برد (۶).

Konyalıoglu و همکارانش نشان دادند که تیمار عصاره آبی کاکوتی کوهی به‌مدت ۲۱ روز، موجب اثر آنتی‌هیپرگلیسمیک وابسته به دوز در رت‌های دیابتی‌شده توسط استرپتوزوتوسین می‌گردد. یافته‌های آن‌ها اثرات مثبت کاکوتی کوهی را بر رت‌هایی که توسط استرپتوزوتوسین دچار اختلالاتی در پروفیل لیپوپروتئین، وضعیت آنتی‌اکسیدان و تحمل گلوکز شده بودند، نشان داد پس، عصاره آبی کاکوتی کوهی، در کنترل دیابت، اختلال در پروفیل لیپید و استرس اکسیداتیو با فعال‌نمودن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پانکراسی مفید است (۷). در نتیجه هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی کاکوتی کوهی بر میزان انسولین، گلوکز سرم، هورمون تستوسترون و آسیب‌های بیضه ای ناشی از دیابت ایجاد شده با استرپتوزوتوسین در موش‌های صحرایی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

**گیاه کاکوتی کوهی (Ziziphora clinopodioides Lam):** در بهار ۱۳۹۴ از روستای ابر شهرستان شاهرود جمع‌آوری شد و نام علمی این گیاه توسط اساتید بیوسیستماتیک گیاهی دانشگاه آزاد دامغان با کد ۱۵۷۱۰۰۴۰تایید شده است. پس از تمیز کردن، گیاه در سایه و در فور یا آون ۳ درجهٔ سانتی‌گراد خشک شد. سپس برگ های‌خشک شده پودر گردید و (حدود ۸۰ گرم) با ۴۰۰ میلی‌لیتر اتانل (۸۰ درصد) در دستگاه سوکسله به‌مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت. سپس عصاره، صاف شد و توسط دستگاه روتاری، خشک گردید.

**حیوانات:** در این مطالعه ۳۲ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار، با محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۲۰ گرم، انتخاب و به چهارگروه هشت تایی بصورت زیر تقسیم گردیدند.

۱-**گروه شاهد:** شامل هشت سر موش نر که همزمان با دیابتی شدن سایر گروه‌ها بمنظور حفظ تعادل بدن بافرسیترات بصورت درون صفاقی با توجه به وزن دریافت کردند.

۲-**گروه دیابتی:** از طریق تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین (محصول شرکت سیگما با کد علمی S0130) با دوز ۵۵mg/kg دیابتی شده و سنجش قندخون برای القای دیابت، ۷۲ ساعت بعد از تزریق یکبار (STZ=Sterptozotosin) (S0130) و با استفاده از خون سیاهرگ دمی، به کمک دستگاه کلوگوکارد صفر و یک انجام شد و موش‌های با قندخون بالاتر از (۲۵۰mg/dl) دیابتی در نظر گرفته شدند(۵).

۳- **گروه تجربی۱:** پس از گذشت دو ماه از دیابت، کاکوتی کوهی را با دوز ۱۰۰ mg/kg یکبار در روز بصورت روزانه بصورت گاواژ دریافت کردند.

۴- **گروه تجربی۲:** پس از گذشت دو ماه از دیابت، کاکوتی کوهی را با دوز ۱۵۰ mg/kg یکبار در روز بصورت گاواژ دریافت کردند.

موش ها در قفس‌های تمیز با درجهٔ حرارت۲۴-۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد و سیکل نوری ۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۶۰-۴۰ درصد در آزمایشگاه نگهداری شدند. در ابتدای هفته پنجم پس از بیهوشی توسط (کتامین و زایلزین) از نمونه‌ها خونگیری مستقیم از قلب به عمل آمده و فاکتورهای بیوشیمیایی و هورمونی خون و مشاهدات ماکروسکوپی اعم از (وزن، قطر، طول، حجم بیضه) مورد ارزیابی قرار گرفت و مقاطع بیضه ها برای انجام آزمایشات هیستولوژیک در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد و به آزمایشگاه منتقل شد.

**بررسی ماکروسکوپی:** برای بررسی وزن بیضه از ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ گرم استفاده شد. طول و قطر بیضه نیز با استفاده از کولیس و حجم بیضه نیز با کمک استوانه مدرج اندازه گیری شد (۱).

**اندازه گیری قطر توبول سمینیفروس:** به منظور ثبوت بافت، نمونه های تهیه شده، به مدت ۴۸ ساعت در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. پس از آنکه بافت ثابت گردید، برای قالبگیری آنها در پارافین پاساژ بافت انجام شد. با استفاده از میکروتوم با تیغه ثابت، برشهایی به ضخامت ۵ میکرون به صورت متوالی تهیه گردید. برشها به بن ماری منتقل شده و بر روی لام آغشته به چسب آلبومین قرار داده شد. نمونه ها در دمای معمولی اتاق خشک شده و بعد از گذشت ۲۴ ساعت لام ها آماده رنگ آمیزی بود. در این تحقیق از روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین استفاده شد. قطر توبول سمینیفروس با استفاده از روش سینگ اندازه گیری شد. ۲۵توبول به طور تصادفی در هر برش عرضی بیضه انتخاب و میانگین قطر توبولی با اندازه گیری قطر کوچک و بزرگ هر توبول با استفاده از یک میکرومتر کالیبره شده و متصل به چشمی میکروسکوپ محاسبه گردید و همچنین برای بررسی اسپرماتوژنز در همان تعداد توبول نیز تعداد اسپرماتوسیت های ۲و۱، اسپرماتید، تعداد دستجات اسپرمی لومینال و ضخامت غشا پایه مورد بررسی قرار گرفته است(۲).

**شمارش سلول های سرتولی:** ۲۵ توبول در هر فیلد و در هر برش عرضی بیضه انتخاب و سپس در زیر میکروسکوپ تعداد سلول های سرتولی شمارش شد. میانگین این تعداد برای هر گروه محاسبه گردید(۲). مقایسه بافتی در گروههای مختلف با کمک تست آنالیز واریانس یکطرفه با فرمول زیر انجام شده است:

$$\text{قطر توبول سمینیفروس} = \sqrt{(\text{بزرگ‌نمایی} \times L) \times (\text{بزرگ‌نمایی} \times B)}$$

L: طول (قطر بزرگ توبول)، B: عرض (قطر کوچک توبول)

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.12.7.0 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.12.43 ]

**روش آنالیز هورمون تستوسترون:** بخش تستوسترون در سرم با پلاسما با Gamma-B Testesteron kit (محصول شرکت زیست شیمی) انجام می‌گیرد. شیوه RIA با آنتی بادی مضاعف اساس کار این کیت می باشد. در این کیت به ترتیب مقادیر مشخص از نمونه، تستوسترون نشان دار (T-۱۲۵۱) و آنتی‌سرم تستوسترون به هم افزوده شدند. پس از انکوباسیون درجه حرارت معمولی نمونه انکوبه شده و بعد سانتریفوژ می گردد تا رسوب جدا شود. تعداد جایگاههای اشغال شده آنتی سرم به وسیله تستوسترون نشان دار، با غلظت تستوسترون نمونه رابطه عکس دارد. شمارشگرهای گاما و مقایسه نتایج با سرم های استاندارد، غلظت تستوسترون را مشخص میکند.

**روش آنالیز هورمون انسولین:** بعد از جدا کردن سرم خون از محتویات خونی توسط کیت زیست شیمی انسولین خون مورد سنجش قرار گرفت.

**روش آنالیز گلوکز خون:** بعد از جدا کردن سرم خون از محتویات خونی توسط کیت پارس آزمون، گلوکز خون مورد سنجش قرار گرفت، بمنظور اطمینان از قند خون بالای گروه ها یک روز در میان با دستگاه گلوکوکارد صفر یک از سیاهرگ دمی خونگیری تا پایان طول درمان انجام می شد.

**تجزیه و تحلیل آماری:** محاسبه آماری با استفاده ار نرم‌افزار آماری نسخه spss21 انجام شد و برای مقایسه میانگین بین گروه ها از آنالیز واریانس یک طرفه و در مواردی که پاسخ معنی داری دیده شد از پس آزمون توکی برای یافتن جایگاه اختلاف استفاده شد و $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

حیوانات دیابتی به عوارض متعدد ناشی از دیابت، شامل: پرخوری، پر نوشی و اسهال مبتلا شدند. بافت بیضه در گروه شاهد با لایه آلبوژینه پوشیده و مجموعه های سلولی توبول سمینیفروس مشاهده شدند. ساختارهای بافتی در گروه دیابتی تخریب شده و کاهش قابل توجه ای در مجموعه های سلولی مشاهده گردید و ساختار های بافتی در گروه درمان با کاکوتی با دوز ۱۵۰ mg/kg بهبود معنی داری یافت (جدول۱). تعداد سلول های اسپرماتوژنیک در گروه دیابتی نسبت به شاهد کاهش داشته و تعداد سلولهای اسپرماتوژنیک در گروه تجربی ۱ و ۲ (که وابسته به دوز داروی مصرفی می باشند) نسبت به گروه دیابتی افزایش معنی داری یافته است ($p<۰/۰۵$) و همچنین در گروه تجربی ۲ که دوز داروی مصرفی بیشتر از گروه تجربی ۱ هست افزایش معنی داری در میزان سلولهای اسپرماتوژنز و ضخامت غشا پایه و سلولهای سرتولی مشاهده گردید (شکل ۱).

افزایش در ضخامت غشای پایه در گروه دیابتی نسبت به شاهد دیده شد. همچنین مشخص شد که آتروفی توبول های سمینیفروس در موشهای صحرایی دیابتی افزایش شدیدی یافته اما با مصرف کاکوتی کوهی از میزان این آسیب ها کاسته میشود. کاهش معنی داری در وزن، قطر، طول و حجم بیضه ها در گروه دیابتی نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید. همچنین افزایش معنی داری در وزن، قطر، طول و حجم بیضه ها در گروه تجربی ۲ نسبت به گروه دیابتی مشاهده گردید(جدول ۲).

پس از بررسی آزمایش هورمون ها و سرم خون مشخص گردید که گروه دیابتی کاهش معنی داری در میزان تستوسترون، انسولین نسبت به گروه شاهد داشته است و همچنین افزایش معنی داری در میزان گلوگز خون نسبت به شاهد مشاهده گردید. در گروه تجربی ۱و۲ نسبت به گروه دیابتی افزایش معنی داری در میزان انسولین و تستوسترون وجود داشته و در تجربی ۲ نسبت به ۱ با توجه به افزایش دوز داروی مصرفی نیز افزایش معنی داری در میزان انسولین مشاهده نگردید و همچنین کاهش معنی داری در میزان گلوگز سرم در گروه تجربی۲ نسبت به تجربی۱ مشاهده گردید (جدول ۳).

**جدول ۱. مقایسه تعداد سلولهای بافتی بیضه در گروه های مختلف مورد بررسی**

| گروه ها / متغیرها | شاهد Mean±SD | دیابتی Mean±SD | تجربی ۱ Mean±SD | تجربی ۲ Mean±SD |
|---|---|---|---|---|
| اسپرماتوگونی(number) | ۷۸/۱۸±۱۰/۲۰a | ۵۸/۸۲±۶/۱۱bc | ۶۵/۵۲±۲/۱۶cd | ۶۹/۲۷±۴/۰۹d |
| اسپرماتوسیت(number) | ۶۳/۳۳±۳/۲۹ a | ۴۸/۳۳±۵/۴۶ b | ۵۴/۸۳±۴/۰۴ c | ۵۷/۶۳±۲/۶۶c |
| اسپرماتید(number) | ۱۲۵/۸۵±۲/۹۴a | ۷۸/۳۲±۵/۳۹ b | ۱۰۰/۳۳±۳/۳۸c | ۱۱۴/۸۳±۴/۸۰d |
| سلول های سرتولی(number) | ۱۷/۳۳±۱/۵۷acd | ۵/۵۵±۰/۸۷ b | ۱۵/۰۰±۳/۴۲ c | ۱۹/۰۰±۱/۸۵ d |
| ضخامت غشاپایه(mm) | ۱/۵۸±۰/۲۴ a | ۲/۵۷±۰/۱۷ b | ۱/۵۱±۰/۲۳ a | ۱/۰۹±۰/۰۶ c |
| توبول سمینی فر(قطر)(mm) | ۲۶۷/۶۴±۷/۴۱ a | ۱۹۶/۳۶±۷/۳۵b | ۲۳۶/۱۰±۹/۴۶c | ۲۴۱/۹۳±۶/۴۶c |

**جدول ۲. مقایسه تغییرات مورفولوژیک بافت بیضه در گروههای مختلف مورد بررسی که با دامنه های $p<۰/۰۵$، $p<۰/۰۱$ و $p<۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه شاهد تعریف گردیده است**

| گروه ها / متغیرها | شاهد Mean±SD | دیابتی Mean±SD | تجربی ۱ Mean±SD | تجربی ۲ Mean±SD |
|---|---|---|---|---|
| وزن بیضه(gr) | ۲/۵۳±۰/۴۵ a | ۱/۱۵±۰/۲۱b | ۱/۷۱±۰/۲۱ c | ۱/۷۸±۰/۵۵c |
| قطر بیضه (mm) | ۱/۱۸±۰/۱۸ a | ۰/۶۷±۰/۱۲b | ۰/۸۸±۰/۱۴ b | ۱/۲۲±۰/۲۱a |
| طول بیضه (mm) | ۲/۰۴±۰/۰۳ a | ۱/۴۱±۰/۲۵b | ۱/۷۰±۰/۱۴ab | ۱/۸۰±۰/۴۵a |
| حجم بیضه ($cm^3$) | ۲/۰۵±۰/۱۶ a | ۱/۰۴±۰/۱ b | ۱/۲۷±۰/۲۱b | ۱/۵۵±۰/۲۰c |

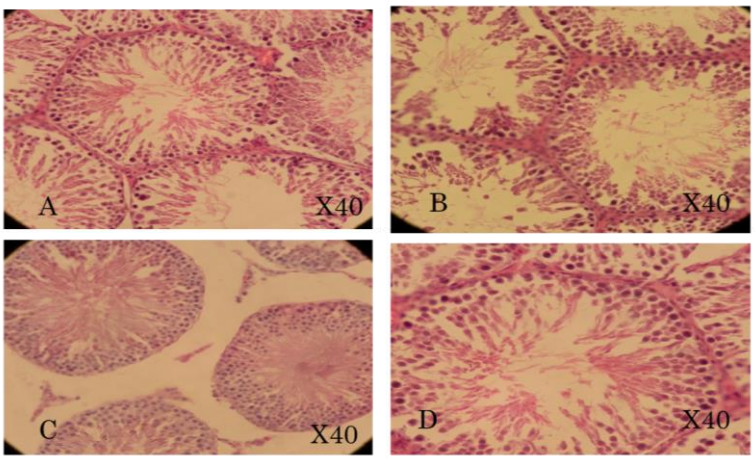
حروف غیر مشابه نشان دهنده تغییر معنی دار $p<۰/۰۰۱$ حروف مشابه نشان دهنده تغییر غیر معنی دار می باشند

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.12.7.0 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.12.43 ]

**جدول ۳. مقایسه هورمونها و سرم خون در گروه های مختلف مورد بررسی**

| گروه ها / متغیرها | شاهد Mean±SD | دیابتی Mean±SD | تجربی ۱ Mean±SD | تجربی ۲ Mean±SD |
|---|---|---|---|---|
| تستوسترون | ۴/۱۳±۰/۴۲ a | ۰/۳۴±۰/۰۴ b | ۱/۴۳±۰/۱۶ c | ۲/۰۷±۰/۸۳ c |
| انسولین | ۴/۶۹±۰/۳۷ a | ۰/۱±۰/۰۷ b | ۲/۶۵±۰/۳۶ c | ۳/۱۱±۰/۴۵ c |
| گلوکز | ۸۵/۵±۴۲/۰۶a | ۳۰۰/۹±۴۲/۵۶b | ۲۲۰/۵±۳۶/۱۲c | ۱۹۰/۴±۷۴/۹۸d |

**حروف غیر مشابه نشان دهنده تغییر معنی دار $p<0/05$ حروف مشابه نشان دهنده تغییر غیر معنی دار می باشند**




**شکل ۱. A,B,C,D نشان دهنده لوله های اسپرم ساز با بزرگنمایی X40 هستند. A– لوله اسپرم ساز و سلول سرتولی را در گروه شاهد نشان میدهد .B– چروکیده شدن لوله اسپرم ساز، افزایش فضای بینابینی و کاهش سلول های زایند و سلول های سرتو لی را در گروه دیابتی نشان می دهد. C– افزایش قطر لوله های اسپرم ساز و افزایش سلولهای سرتولی و کاهش چشمگیر فضای بینابینی نسبت به دیابتی را در گروه تجربی ۱ و ۲ نشان می دهد.**

## بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه تیمار طولانی مدت عصاره هیدروالکلی (۸۰٪) کاکوتی کوهی به حیوانات دیابتی، موجب بهبود آسیبهای بیضه ای اعم از بررسی های ماکروسکوپی و میکروسکوپی ناشی از دیابت در مقایسه با موش های دیابتی بدون هیچ تیماری شده است. در این مطالعه افزایش معنی داری در میزان هورمون تستوسترون و انسولین در گروه های تجربی نسبت به شاهد مشاهده شد که علت این امر را میتوان به تحریک ترشح انسولین در بدن توسط کاکوتی نسبت داد (۹و۸). بیماری دیابت باعث افزایش استرس اکسیداتیو و ایجاد اکسیژن فعال شده و منجر به آسیبهای سلولی از طریق پر اکسیداسیون چربیها و تخریب اکسیداتیو پروتئینها و DNA می شوند(۱۰). ضخامت غشای پایه لوله های اسپرم ساز نیز نقش مهمی در اسپرماتوژنزیس ایفا می نماید(۱۱). طی دیابت ضخامت غشای پایه لوله های اسپرم ساز افزایش یافته، این افزایش، کاهش تولید اسپرم و در نهایت کاهش اندازه توبول اسپرم ساز را به دنبال خواهد داشت از طرف دیگر ارتباط مثبتی بین قطر توبولی و فعالیت اسپرماتوژنز وجود دارد (۱۲). کاکوتی کوهی باعث عدم فعال شدن پروتئین کیناز –C، کاهش گلیکاسیون پروتئین ها، لیپید ها و در نتیجه تغییرات در فعالیت آنزیم های سلول و افزایش آنتی اکسیدان ها می شود و از این طریق سبب کاهش اثرات مخرب دیابت بر بافت بیضه گردید. در این تحقیق از دارو با روش گاواژ به مدت ۳۵ روز به موشها داده شد،که در روش گاواژ بدلیل فراهم زیستی دیرتر مناسبترین زمان ۳۵ روز می باشد و نسبت به روش تزریق زیر جلدی یا درون صفاقی در بدن مدت طولانی تری اثر خود را می گذارد. این تحقیق دارای نقاط ضعف و قوت نیز می باشد، از نقاط ضعف آن می‌توان به عدم بررسی و آزمایش، فعالیت ضد رادیکال آزاد کاکوتی کوهی و همچنین عدم مقایسه این دارو با دیگر آلکلوئیدها، اشاره کرد. نقاط قوت نیز به تعداد جامعه آماری مناسب و روش گاواژ برای پرداخت دارو نیز اشاره کرد، چراکه در روش گاواژ داروها با فاصله زمانی مناسب اعمال اثر در بدن می کنند. در گروه دیابتی بدلیل آسیب های دیابت از جمله تولید رادیکال آزاد سبب کاهش پارامترهای سلولهای اسپرم ساز می‌شود و کاکوتی کوهی این عوارض را با تحریک اسپرماتوژنز تصحیح می‌کند. ارتباط منطقی بین تمامی پارامترها گویای این است که هرچه دوز دارو افزایش یافت تعداد سلولهای اسپرم ساز به علت وجود مواد آنتی اکسیدانی فراوان افزایش یافت که این نشان دهنده تاثیر مثبت دارو بر آسیب های حاصل از دیابت هست. Ghafari و همکاران نشان دادند که تیمار عصاره هیدروالکلی (۵۰٪) میوه کاکوتی کوهی موجب کاهش گلوکز سرم در رت‌های تیمار شده توسط آلوکسان می‌گردد (۴). یک مطالعه برای اولین بار اثر آنتی‌هیپرگلیسمیک عصاره میوه کاکوتی کوهی را گزارش کرد که یک داروی یونانی مورد استفاده توسط پزشکان یونانی برای درمان دیابت است که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر نیز همخوانی داشت (۱۳).

کاکوتی کوهی با فعال‌نمودن رسپتورهای فعال‌شده تکثیر پراکسیزوم (Peroxisome proliferator-activated receptor=PPAR) دارای عمل ضددیابتی است. گالیک اسید موجود در این بخش ازگیاه، ترکیب مهم

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.12.7.0 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.12.43 ]

و موثر ایـن گیـاه اسـت (۱۴).سـلولهای اسـپرم پسـتانداران دارای مقـادیر بـالای اسیدهای چرب غیراشباع، پلاسمالوژن و اسفنگومیلین است که سوبستراهای مهـم در عمل اکسیداسیون به شمار می‌روند (۱۵). در حالت طبیعی، ساز و کارهای آنتـی اکسیدانی در بافتهای تولید مثلی وجـود داشـته و از بـروز آسـیبهای اکسـیداتیو در سلولهای گنادی و اسپرماتوزوآیی بالغ جلوگیری می‌کنند که وجود آنتی‌اکسیدان ها در کاکوتی کوهی نیز اثرات مضر دیابت را از بـین بـرده و در گـروه هـای تجربـی بهبود بافتی و ماکروسکوپی بیضه مشاهده می شود (۱۷و۱۶).

در تحقیقی دیگر به اثـرات مهـم کـاکوتی کـوهی اشـاره شـد کـه تغییـرات چشمگیر در قطر لوله را در سلولهای I و II اسـپرم سـاز و مهـار اسـپرماتوژنز در مراحل اسپرماتوسیت توبولهای کوچک حیوانات دیابتی روی می دهد که در نتایج ما نیز کاهش قطر لوله اسپرم ساز و افزایش قطر غشای پایه در گروه های دیابتی مؤید آن می‌باشد و با نتـایج حاصـل از ایـن پـروژه همخـوانی دارد. همچنـین در گروههای دیابتی تیمار شده به نظر می رسد کاکوتی کـوهی بـا مکانیسـم هـای متعدد منجر به افزایش قطر توبول، کـاهش غشـای پایـه و بهبـود در سـلولهای اسپرماتوژنیک گردیده است (۲۲). در کل مطالعات میکروسکوپ نـوری حاصـل از این پروژه نشان دادند که در بیضه های رت دیابتی افزایش ضخامت غشـای پایـه لوله های سمنیفر متعاقب دیابت طی درمان به مدت ۵ هفته با کاکوتی کـوهی بـه طور معنی داری کاهش می یابد. همچنین بـا توجـه بـه نتـایج حاصـل از تحقیـق حاضر کاهش در تعداد سلول های سرتولی منجر به کاهش در تعداد اسپرماتوگونی می‌شود (چراکه وظیفه تغذیه سـلولهای اسـپرم سـاز را بـر عهـده دارد). سـلولهای سرتولی از طریق تامین حمایت فیزیکی، تغذیه ای و سیگنال های هورمـونی لازم برای اسپرماتوژنز موفق نقش حیاتی در اسپرماتوژنز بازی می‌کند. بنـابراین هنگـام کاهش تعداد سلول‌های سرتولی بـه شـدت از تعـداد سـلول هـای زاینـده کاسـته می شود. در مطالعه حاضر دیابت باعث کاهش تعـداد سـلول هـای سـرتولی و بـه دنبال آن کاهش تعداد سلولهای زاینده گردید.

در این مطالعه مشخص گردید که دیابت در موش های صـحرایی نـر باعـث اختلال عملکرد بیضه ها گردیده و درمان با کـاکوتی کـوهی از طریـق محافظـت لوله‌های اسپرم ساز و نیز سلولهای اسپرماتوژنیک این اختلال در عملکرد را بهبـود بخشیده است، در مجموع تمامی آسیب های ناشی از دیابت در گـروه تجربـی دوم (دیـــابتی+ کـــاکوتی ۱۵۰mg/kg) بهتـــر از تجربـــی اول (دیابتی+کـــاکوتی ۱۰۰mg/kg) می‌باشـد و بدینوسـیله توصـیه مـی گـردد مـردان دیـابتی و دارای اخـتلالات جنسـی از عصـاره هیـدروالکلی کـاکوتی کـوهی روزانـه بـه میـزان ۱۵۰mg/kg مصرف کنند.

## تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علـوم پزشـکی یـزد و کلیـه افرادی که مار ا در انجام این تحقیق یاری رسانده اند، تقدیر و تشکر می گردد.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.12.7.0 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.12.43 ]

# The Effect of Hydroalcoholic Extract of Ziziphora Clinopodioides Lam on Testicular Damage Caused by Diabetes Mellitus in Male Rats

**N. Bolbol Haghighi (MSc)[1], S. Molzemi (MSc)*[2], Sh. Goli (PhD)[3], H. Mohammad Sadeghi (MSc)[4], M. Aminian (MD)[5]**

1.Department of Midwifery, Faculty of Nursing and Midwifery, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, I.R.Iran
2.Department of Laboratory Sciences, Faculty of Medical Sciences, Islamic Azad University, Shahrood Branch, Shahroud, I.R.Iran
3.Research Center for Social and Behavioral Sciences in Health, Faculty of Public Health, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, I.R.Iran
4.Department of Physiology, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, I.R.Iran
5.Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Aja University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

**J Babol Univ Med Sci; 19(12); Dec 2017; PP: 43-9**
**Received: Jun 28th 2017, Revised: Apr 9th 2017, Accepted: Sep 21th 2017.**

## ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Considering that mellitus diabetes has adverse effects on spermatogenesis and male fertility and given the easy and safe access to herbal medicines to treat diabetes complications, this study investigated the preventive and therapeutic effects of ziziphora clinopodioides lam on testicular damage in male rats.

**METHODS:** In this experimental study, 32 male Wistar rats weighing 200 to 220 g were divided into four groups of eight. The control group, the group that became diabetic through intraperitoneal injection of 55 mg/kg streptozotocin, experimental group 1 (diabetic+100 mg/kg ziziphora clinopodioides lam by gavage) and experimental group 2 (diabetic +100 mg/kg ziziphora clinopodioides lam by gavage) that became diabetic after two months, and received ziziphora clinopodioides lam extract by gavage for five weeks. Blood samples were collected at the beginning of the fifth week, and the testes were examined macroscopically (right testis) (length, volume, weight and diameter of testes) and histologically (left testis) (spermatogenesis count).

**FINDINGS:** In the diabetic group, there was a significant decrease in spermatogonial cells (58.22±6.11) compared with control (78.18±10.20) ($p<0.001$) and significant decrease was observed in sertoli cells in diabetic group (5.55±0.87), compared to the control group (17.33±1.57) ($p<0.001$). In addition, a significant increase was observed in spermatid cells in the experimental group 2 (114.83±4.80) compared with the experimental group 1 (100.33±3.38) ($p<0.001$).

**CONCLUSION:** The results of the study showed that long-term administration of ziziphora clinopodioides lam is effective in the diameter and thickness of the spermatic ducts. Therefore, treatment with ziziphora clinopodioides lam can improve the spermatogenesis of diabetic men.

**KEY WORDS:** *Diabetes, Insulin, Testosterone.*

Bolbol Haghighi N, Molzemi S, Goli Sh, Mohammad Sadeghi H, Aminian M. The Effect of Hydroalcoholic Extract of Ziziphora Clinopodioides Lam on Testicular Damage Caused by Diabetes Mellitus in Male Rats. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(12):43-9.

* **Corresponding author: S. Molzemi (MSc)**
**Address:** Department of Laboratory Sciences, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, I.R.Iran
**Tel:** +98 23 32390380
**E-mail:** saharmolzemi@yahoo.com

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.12.7.0 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.12.43 ]

## References

1.Anbarian F, Fatemi tabatabaei S, Kazeminezhad I, Mohammadian S. Effects of iron oxide nanoparticles and iron ions on reproductive indices of pregnant syrian rats and neuro-behavioral development of newborns. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(3): 45-53[In Persian]

2.Ghorbani Ranjbary A, Ghorbani Ranjbary N, Ghorbani Ranjbary Z, Jouibar N. Effects of intraperitoneal injection of extracts of origanum vulgare on gonadotropin and testosterone hormones in male wistar rats. J Babol Univ Med Sci. 2014;16(4):57-63. [In Persian]

3.Ghorbani A, Farahani MA, Mohammadi N. Relationship between sleepiness, physical activity and functional outcomes in iranian patients with type II diabetes. Jundishapur J Chronic Dis Care. 2014;3(1):54-60. [In Persian]

4.Ghafari H, Yasa N, Mohammadirad A, Dehghan G, Zamani MJ, Nikfar S, Khorasani R, et al. Protection by Ziziphora clinopoides of acetic acid-induced toxic bowel inflammation through reduction of cellular lipid peroxidation and myeloperoxidase activity. Hum Exp Toxicol. 2006;25(6):325-32.

5.Sadeghi H, Mansourabadi A, Moogooei M, Nahvinejad M. Antimicrobial effects of Ziziphora clinopodioides extracts on Salmonella typhi Vi+ in vitro, in vivo and amp; amp; cell culture. Clinical Biochemistry. 2011;44(13): 326-30.

6.Tian S, Shi Y, Zhou X, Ge L, Upur H. Total polyphenolic (flavonoids) content and antioxidant capacity of different Ziziphora clinopodioides Lam. extracts. Pharmacognosy magazine. 2011;7(25): 65-70.

7.Konyalıoglu S, Ozturk B, Meral G. Comparison of chemical compositions and antioxidant activities of the essential oils of two ziziphora taxa from anatolia. Pharmaceutical Boil. 2006;44(2):121-6.

8.Sadeghi H, Mansourabadi A, Emami s, Nahvinejad M, Moogooei M. The effect of Ziziphora ethanolic extract on active pancreatic beta cells on streptozotocin induced diabetic mice. Iran J Diabete Metabol. 2015;14(6):373-8. [In Persian].

9.International Diabetes Federation (IDF) Diabetes prevalence. Available From:http://www.diabetesatlasorg.

10. Saddichha S. Diagnosis and treatment of chronic insomnia. Ann Indian Acad Neurol 2010;13(2):94-102.

11. Vishnu A, Shankar A, Kalidindi S. Examination of the association between insufficient sleep and cardiovascular disease and diabetes by race/ethnicity. Int J Endocrinol. 2011;2011:789358.

12. Nagai M, Hoshide S, Kario K. Sleep duration as a risk factor for cardiovascular disease-a review of the recent literature. Curr Cardiol Rev. 2010 6(1):54-61.

13.Cho EH, Lee H, Ryu OH, Choi MG, Kim SW. Sleep Disturbances and Glucoregulation in Patients with Type 2 Diabetes. J Korean Med Sci. 2014;29(2):243-7.

14.Luyster FS, Dunbar-Jacob J. Sleep quality and quality of life in adults with type 2 diabetes. Diabetes Educ. 2011;37(3):347-55.

15.Maracy MR, Kheirabadi GR, Fakhari N, Zonnari R. Comparison of night time sleep quality in type 2 diabetics, impaired glucose tolerance cases and non-diabetics. Iran J Endocrinol Metab. 2011;13(2):165-72. [In Persian]

16.Ardani AR, Talaei A, Borhani Moghani M, Nejati R, Sabouri S, Solooti S, et al. Assessment the rules of demographic variables and body mass index in sleep quality among medical students. J Fundamentals Mental Health. 2012;14(2):132-9. [In Persian]

17.Kita T, Yoshioka E, Satoh H, Saijo Y, Kawaharada M, Okada E, et al. Short sleep duration and poor sleep quality increase the risk of diabetes in Japanese workers with no family history of diabetes. Diabetes Care. 2012;35(2):313-8.

18.Magee CA, Kritharides L, Attia J, McElduff P, Banks E. Short and long sleep duration are associated with prevalent cardiovascular disease in Australian adults. J Sleep Res. 2012;21(4):441-7.

19. Cappuccio FP, D'Elia L, Strazzullo P, Miller MA. Quantity and quality of sleep and incidence of type 2 diabetes a systematic review and metaanalysis. Diabetes Care. 2010;33(2): 414-20.

20.Altay B, Cetinkalp S, Doganavsargil B, Hekimgil M, Semerci B. Streptozotocin-induced diabetic effects on spermatogenesis with proliferative cell nuclear antigen immunostaining of adult rat testis. Fertil Steril. 2003;5(50):20-5.

21. Ulmer CS, Bosworth HB, Germain A, ndquist J, Olsen M, Brancu M, et al. Associations between sleep difficulties and risk factors for cardiovascular disease in veterans and active duty military personnel of the Iraq and Afghanistan conflicts. J Behav Med. 2015;38(3):544-55.

22.Huang TH., HYang Q, Harada M, Li GQ, Yamahara J, Roufogalis BD, Li Y. Pomegranate flower extract diminishes cardiac fibrosis in Zucker diabetic fatty rats: modulation of cardiac endothelin-1 and nuclear factor-kappaB pathways. J Cardiovascular Pharmacol. 2015;46(6):856-62.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1396.19.12.7.0 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jbums.19.12.43 ]