

مطالعه اثر محافظتی عصاره لیپیدیوم ساتیوم بر اسپرمتوزنز در بیضه رت دیابتی شده با استرپتوزتوسین

معصومه فغانی (PhD)^۱، فهیمه محمد قاسمی (PhD)^{۱*}، گیتی کیهی (MSc)^۲

۱- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان

۲- آموزش و پرورش شهرستان انزلی

دریافت: ۹۱/۳/۲۱، اصلاح: ۹۱/۴/۱۴، پذیرش: ۹۱/۶/۸

خلاصه

سابقه و هدف: اختلال در باروری یکی از عوارض دیابت می باشد. دیابت، استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی در بیضه ایجاد می کند. لیپیدیوم ساتیوم یا شاهی، گیاهی با خواص ضد دیابتیک می باشد. این مطالعه به منظور بررسی اثر محافظتی عصاره لیپیدیوم ساتیوم بر اثرات دیابتیک و تخریبی ناشی از استرپتوزتوسین در بیضه رت انجام شد. **مواد و روشها:** در این مطالعه تجربی ۳۶ رت بالغ بطور تصادفی به شش گروه شش تائی تقسیم شدند. گروه ۱ یا کنترل، نرمال سالین و گروههای ۲ و ۳ به ترتیب ۲۰۰ و ۴۰۰ mg/kg عصاره لیپیدیوم ساتیوم دریافت نمودند. گروه ۴ ۶۵ mg/kg استرپتوزتوسین جهت القاء دیابت و گروه ۵ و ۶ علاوه بر ۶۵ mg/kg استرپتوزتوسین، به ترتیب ۲۰۰ و ۴۰۰ mg/kg عصاره لیپیدیوم ساتیوم دریافت نمودند. استرپتوزتوسین بصورت تک دوز و عصاره لیپیدیوم ساتیوم و نرمال سالین به مدت ۲۱ روز، روزی یکبار تجویز شد. ۲۲ روز پس از شروع آزمایشات حیوانات تشریح و بیضه آنها مورد ارزیابی هیستولوژیک و مورفومتریک قرار گرفت. **یافته ها:** درمان با استرپتوزتوسین باعث اختلال اسپرمتوزنز و کاهش معنی دار ضخامت اپی تلیوم ژرمینال ($70/8 \pm 4/65 \mu$) در مقایسه با گروه کنترل ($95/60 \pm 6/87 \mu$) شد ($p < 0/05$). درمان با عصاره لیپیدیوم ساتیوم به میزان ۲۰۰ و ۴۰۰ mg/kg به ترتیب باعث کاهش معنی دار ضخامت اپی تلیوم ژرمینال به $70/20 \pm 7/56 \mu$ و $77/50 \pm 6/12 \mu$ در مقایسه با گروه کنترل شد ($p < 0/05$). **نتیجه گیری:** نتایج مطالعه نشان داد که استفاده از عصاره لیپیدیوم در دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ mg/kg بر روی بافت بیضه اثر توکسیک دارد و نمی تواند اسپرمتوزنز را در بیضه دیابتیک ناشی از استرپتوزتوسین محافظت نماید.

واژه های کلیدی: لیپیدیوم ساتیوم، هیستومورفومتري، اسپرمتوزنز، دیابت، استرپتوزتوسین.

مقدمه

پراکسیده شدن لیپیدها در کبد مربوط می باشد (۷). عصاره دانه اثر ضد التهاب نیز دارد. ویژگیهای دارویی این گیاه همانند داروهای ضد التهاب بدون استرادیول (NSAID) است، یکی از مهمترین مکانیزمهایی که در فعالیت ضد التهابی NSAID موثر است ناشی از مهار سنتز پروستاگلندین است. پیشنهاد شده که فعالیت ضد التهاب عصاره LS به علت مهار سنتز پروستاگلندین است (۸). اثر دانه گیاه در موارد سرطانهای ریوی روده بزرگ و سیستم لنفاتیک بررسی شده است (۹-۱۱). فعالیت آنتی اکسیدانی شاهی به دلیل وجود ترکیبات فنولی آن است (۱۲). دیابت یکی از مهمترین بیماریهایی است که سلامت جامعه جهانی را تهدید می کند و به سرعت در حال افزایش است (۱۳). در ایران شیوع بیماری صرفنظر

گیاه لیپیدیوم ساتیوم (*Lipidium Sativum*, LS) از خانواده Brassicaceae می باشد (۱). این گیاه در مازندران تره تیزک و در سایر مناطق ایران شاهی گفته می شود. ترکیبات شیمیایی موجود در دانه گیاه شامل مقدار زیادی گلوکوزینولاتها (۲) و همچنین کاروتنوئیدهایی مانند لوتئین و بتاکاروتن است (۳). دانه شاهی به عنوان گیاه دارویی آشنا در زمینه کنترل دیابت، فشارخون و بیماری کلیه است (۴). عصاره آبی دانه گیاه اثر دیورتیک در رت ها دارد و بدون اینکه بر سطح انسولین پلاسما تأثیر بگذارد سبب کاهش گلوکز خون در رتهای دیابتی و سالم می شود (۵،۶). عصاره گیاه می تواند کبد را از آسیبی که توسط بعضی مواد شیمیایی مانند $cc14$ وارد می شود محافظت نماید که به توانایی گیاه در مهار کردن

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۳/۱۳۲/۱۲۸۴۵/پ دانشگاه علوم پزشکی گیلان می باشد.

* مسئول مقاله:

آدرس: رشت، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی، تلفن: ۰۳۱-۶۶۹۰۰۹۹

e-mail: parsahistolab@gmail.com

شد. از هر حیوان ۴ اسلاید انتخاب شد و به روش هماتوکسیلین و اتوزین رنگ‌آمیزی شد و با میکروسکوپ نوری (Olympus) مطالعه شد. به منظور مطالعات مورفومتریک پارامترهای لوله سمی نیفروس قطر لومن، ضخامت اپی تلیوم ژرمنال و همچنین قطر لوله سمی نیفروس محاسبه گردید. بدین منظور از گریدهای مدرج خطی که بر روی لنز چشمی نصب شده بود و بصورت میکرون قابل اندازه‌گیری بود، استفاده گردید. ابتدا قطر کوچک d1 و سپس قطر بزرگ d2 در هر لوله سمی نیفروس اندازه‌گیری و میانگین آنها محاسبه شد. قطر لومن و اپی تلیوم ژرمنال نیز به صورت مشابهی بدست آمد. در هر حیوان حداقل ۲۰ لوله سمی نیفروس ارزیابی و مورد بررسی آماری قرار گرفت.

نتایج ریخت‌شناسی میکروسکوپ نوری در نمونه‌های مورد مطالعه با هم مقایسه شد. اطلاعات با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه و آزمون تقییبی توکی تجزیه تحلیل شدند و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در مطالعه بافت شناسی در گروه کنترل نرمال اسپرمتوزن فعال در لوله‌های سمی نیفر در مراحل مختلف همراه با اسپرمهای بالغ یا در حال بلوغ مشاهده شد. در این لوله‌ها اپی تلیوم از ضخامت قابل توجهی برخوردار بود و انواع سلولهای زایا، شامل اسپرمتوگونی، اسپرمتوسیت اولیه، اسپرمتوسیت ثانویه، اسپرمتیدهای جوان گرد و اسپرمتیدهای بالغ دراز یا اسپرمتوزوئید و همچنین سلولهای سرتولی مشاهده شد. در بافت بینابینی بافت همبندی سست همراه با عروق خونی، اعصاب، سلولهای بافت همبندی و همچنین سلولهای لیدینگ بصورت تکی و یا تجمعات سلولی با هسته گرد قابل مشاهده بودند (شکل ۱). در گروه‌های نرمال تحت تیمار شاهی با دوزهای ۲۰۰ mg/kg و ۴۰۰ mg/kg به مدت ۳ هفته کاهش پارامترهای لوله‌های سمی نیفروس مشاهده شد. در گروه کنترل دیابتی اگر چه سازمانبندی لوله‌های سمی نیفروس طبیعی بود ولی کلیه پارامترهای کمی، لوله‌های سمی نیفروس شامل قطر لوله، قطر لومن و همچنین ضخامت اپی تلیوم ژرمنال به طور معنی‌دار کاهش یافت. در رت‌های دیابتی که عصاره دریافت کردند نیز قطر لوله‌های سمی نیفروس و ضخامت اپی تلیوم ژرمنال در مقایسه با گروه دیابتی کنترل به طور معنی‌داری کاهش داشت، ولی در قطر لومن تفاوت معنی دار دیده نشد.

اثر بر قطر لوله‌های سمی نیفروس: در رت‌های نرمال میانگین قطر لوله‌های سمی نیفر در گروه تحت درمان با LS دوز ۲۰۰ mg/kg در مقایسه با گروه کنترل $258/4 \pm 16/74$ در مقابل $207 \pm 12/04$ میکرومتر و در گروه تحت درمان با LS دوز ۴۰۰ mg/kg در مقایسه با گروه کنترل $258/4 \pm 16/74$ در مقابل $208 \pm 19/84$ میکرومتر بود (شکل ۱) که هر دو در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشتند ($p < 0.001$). در رت‌های دیابتی که به عنوان گروه کنترل مثبت در نظر گرفته شدند قطر لوله‌های سمی نیفروس نسبت به گروه کنترل نرمال $258/4 \pm 16/74$ در مقابل $216/4 \pm 12/36$ میکرومتر بود که کاهش معنی‌داری داشتند ($p < 0.001$). (شکل ۱). در رت‌های دیابتی که عصاره نیز دریافت کردند، قطر لوله‌های سمی نیفروس در گروه تحت درمان با LS در دوز ۲۰۰ mg/kg در مقایسه با گروه کنترل دیابتی $216/4 \pm 12/36$ در مقابل $188 \pm 13/91$ میکرومتر و در گروه تحت درمان با LS در دوز ۴۰۰ mg/kg در مقایسه با گروه کنترل دیابتی

از نوع آن حدود ۶-۵٪ است و تقریباً ۴ میلیون فرد مبتلا یا مستعد ابتلا به آن در کشور وجود دارد (۱۴). ناباروری یکی از مهمترین مشکلات سلامتی در جوامع توسعه یافته و در حال توسعه است. اختلال در باروری یکی از عوارض دیابت است (۱۵ و ۱۶). دیابت، استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی در بیضه ایجاد می‌نماید (۱۷). استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت با مشکلات عروقی، اختلال اندوتلیالی و نوروپاتی در بافت نعوظی ارتباط دارد (۱۵). از علایم دیگر دیابت می‌توان به آتروفی بیضه، کاهش وزن بدن و اندام‌های جنسی و نیز کاهش تعداد اسپرم در بیضه و اپیدیدم اشاره نمود (۱۶ و ۱۷).

اهمیت گیاهان دارویی و مشتقات آنها از سالیان گذشته در درمان بیماریهای مختلف از جمله دیابت بر همگان آشکار است و در سالیان اخیر به جهت جلوگیری از اثرات سوء داروهای شیمیایی، تحقیقات متعددی برای جایگزینی داروهای گیاهی انجام شده است (۱۸ و ۱۹). لپیدیوم ساتیوم (شاهی) گیاهی آشنا در زمینه کنترل دیابت است، از آنجاییکه تاکنون تحقیقی بر روی اثر این گیاه بر روند اسپرمتوزن و بافت بیضه انجام شد، لذا این مطالعه به منظور بررسی اثر حفاظتی عصاره هیدروالکلی دانه لپیدیوم ساتیوم در دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ mg/kg به مدت ۲۱ روز بر تخریب ناشی از درمان با استرپتوزوسین در بیضه رت بالغ انجام شد.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی از ۳۶ رت نر بالغ نژاد ویستار با وزن 220 ± 20 استفاده شد. حیوانات از موسسه رازی کرج خریداری شده و برای تطابق با محیط ۲ هفته در قفس‌های خود (در هر قفس ۶ حیوان) با دسترسی آزادانه به آب و غذا و شرایط محیطی استاندارد نگهداری شدند. سپس حیوانات به طور تصادفی به ۶ گروه کنترل، کنترل تحت درمان با عصاره LS در دوز ۲۰۰ mg/kg، کنترل تحت درمان با عصاره LS در دوز ۴۰۰ mg/kg، دیابتی، دیابتی تحت درمان با عصاره LS در دوز ۲۰۰ mg/kg و دیابتی تحت درمان با عصاره LS در دوز ۴۰۰ mg/kg تقسیم شدند. با توجه به گزارشات موجود چون از دوزهای متفاوتی از عصاره لپیدیوم ساتیوم استفاده شده بود لذا بر آن شدیم تا از دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ mg/kg آن استفاده نماییم (۱۱ و ۱۲). الفای دیابت در حیوانات در گروه‌های دیابتی با استفاده از یک تک دوز استرپتوزوسین (Streptozotocin, Sigma) به میزان ۶۵ mg/kg در ۰/۱ میلی لیتر بافر سدیم سیترات بصورت داخل صفاقی صورت گرفت (۶) و بعد از ۳ روز با استفاده از دستگاه IME-DC GmbH (Germany) اندازه‌گیری قند خون انجام گرفت و افزایش قند خون بیشتر از $16/5 \text{ mmol/l}$ ملاک برای دیابتی شدن قرار داده شد (۶). درمان با عصاره به مدت ۲۱ روز بصورت داخل صفاقی یک هفته بعد از تزریق استرپتوزوسین و تأیید ایجاد دیابت انجام شد. ۲۴ ساعت پس از پایان درمان (روز ۲۲) حیوانات با اثر بیهوش شدند و بیضه راست آنان از حفره شکمی خارج و از بافتهای اطراف جدا شد و برای ثبوت در محلول فرمالدئید با فری ۱۰٪ قرار داده شد.

مطالعه بافتی بیضه: پس از گذشت سه روز و اطمینان از ثبوت بافتها نمونه‌ها برای مطالعه با میکروسکوپ نوری، پاساژ بافتی شدند جهت به حداکثر رساندن تعداد لوله‌های سمی نیفروس مورد بررسی، بیضه‌ها بصورت عمودی در پارافین قالبگیری شدند. سپس با استفاده از دستگاه میکروتوم دوار (Letiz, German) مقاطعی با ضخامت ۵ میکرون با فاصله ۵۰ میکرون برداشته

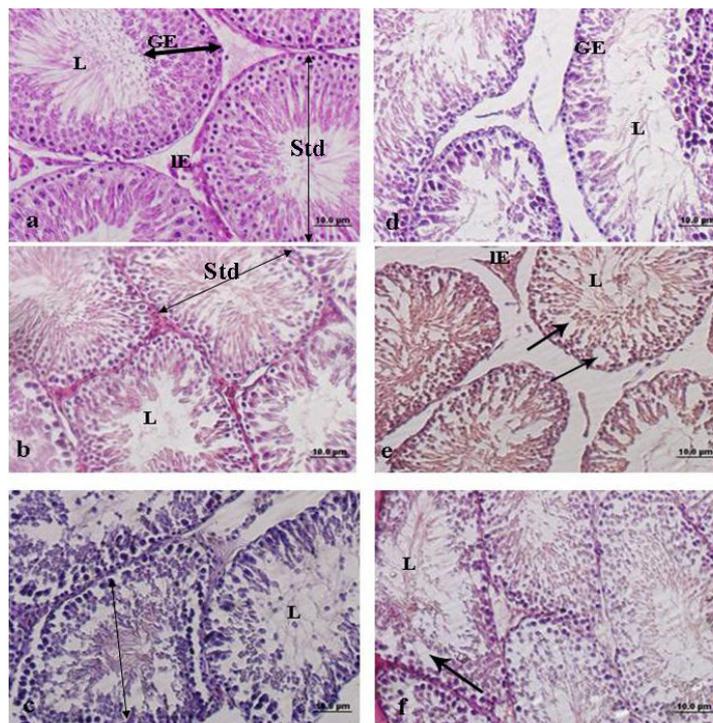
۵۶/۶۰±۹/۸۳ میکرومتر بود (شکل ۱) که هم نسبت به گروه کنترل دیابتی و هم گروه کنترل نرمال کاهش معنی‌داری دیده شد ($p<0/001$). در گروه درمان ترکیبی با استریتوزوتوسین و LS با دوز ۴۰۰ mg/kg ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال ۶۰/۸۰±۴/۵۴ میکرومتر بود (شکل ۱)، که در این گروه نیز، هم نسبت به گروه کنترل دیابتی و هم گروه کنترل نرمال کاهش معنی‌داری دیده شد ($p<0/001$) (جدول ۱). نتایج نشان داد که تیمار رت‌های دیابتی با LS نتوانست باعث بهبودی و یا افزایش ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال در مقایسه با گروه دیابتی درمان نشده گردد.

اثر بر قطر لومن: نتایج بررسی قطر لومن در این مطالعه نشان داد که در رت‌های دریافت کننده عصاره LS با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ mg/kg کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل به ترتیب ۱۵۰±۹/۳۵ در مقابل ۱۱۷/۶۰±۹/۸۱ و ۱۵۰±۹/۳۵ در مقابل ۱۱۳/۰۰±۷/۵۴ دیده شد ($p<0/001$) (جدول ۱ و شکل ۱). علاوه بر این قطر لومن در رت‌های کنترل دیابتی در مقایسه با گروه کنترل ۱۵۰±۹/۳۵ در مقابل ۱۰۹/۸۰±۸/۲۵ نیز کاهش یافته بود ($p<0/001$). در گروه‌های درمان ترکیبی دریافت کننده عصاره LS با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ mg/kg لومن نیز اختلاف معنی‌داری در قطر لومن هر دو گروه نسبت به گروه کنترل دیده شد ($p<0/001$) (شکل ۱) ولی این تفاوت نسبت به گروه کنترل دیابتی وجود نداشت (جدول ۱).

۲۱۶/۴±۱۲/۳۶ در مقابل ۱۸۰/۴۰±۸/۲۶ میکرومتر بود (شکل ۱) که کاهش معنی‌داری هم نسبت به گروه کنترل دیابتی و هم نسبت به گروه کنترل نرمال داشتند ($p<0/001$) (جدول ۱). به طور کلی در رت‌های تحت درمان ترکیبی مصرف عصاره نتوانست باعث بهبود یا افزایش قطر لوله‌های سمی نیفرس در مقایسه با مصرف تنه‌های استریتوزوتوسین شود بلکه بصورت معنی‌داری سبب کاهش قطر لوله‌های سمی نیفرس شد.

اثر بر ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال: نتایج نشان داد که در همه گروه‌های تحت درمان با لیپیدیوم ساتیوم ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال کاهش یافت. میانگین ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال در گروه تحت درمان با LS در دوز ۲۰۰ mg/kg در مقایسه با گروه کنترل ۹۵/۶۰±۶/۸۷ در مقابل ۷۰/۲۰±۷/۵۶ میکرومتر و در گروه تحت درمان با LS در دوز ۴۰۰ mg/kg در مقایسه با گروه کنترل ۹۵/۶۰±۶/۸۷ در مقابل ۷۷/۵۰±۶/۱۲ میکرومتر بود (شکل ۱) که هر دو در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشتند ($p<0/001$) (جدول ۱).

در گروه کنترل دیابتی کاهش معنی‌داری در ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال در مقایسه با گروه کنترل ۹۵/۶۰±۶/۸۷ در مقابل ۷۰/۸۰±۴/۶۵ (شکل ۱) دیده شد ($p<0/001$). در رت‌های دیابتی تحت درمان با LS در دوز ۲۰۰ mg/kg در مقایسه با گروه کنترل دیابتی ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال ۷۰/۸۰±۴/۶۵ در مقابل



شکل ۱. لوله‌های سمی نیفرس در رت‌های نرمال و دیابتی. a: لوله‌های سمی نیفرس در رت‌های نرمال، ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال، قطر لوله سمی نیفرس قطر لومن نسبت به دو گروه دیگر بیشتر است. b: لوله‌های سمی نیفرس در رت‌های نرمال دریافت کننده شاهی با دوز ۲۰۰، ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال، قطر لوله سمی نیفرس قطر لومن کمتر شده است. c: لوله‌های سمی نیفرس در رت‌های نرمال دریافت کننده شاهی با دوز ۴۰۰، ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال، قطر لوله سمی نیفرس قطر لومن کمتر شده است. d: لوله‌های سمی نیفرس در رت‌های کنترل دیابتی، ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال، قطر لوله سمی نیفرس و قطر لومن نسبت به کنترل نرمال کمتر است. e: لوله‌های سمی نیفرس در رت‌های دیابتی دریافت کننده شاهی با دوز ۲۰۰، ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال، قطر لوله سمی نیفرس کمتر شده است. f: لوله‌های سمی نیفرس در رت‌های دیابتی دریافت کننده شاهی با دوز ۴۰۰، به ریزش سلولی در این گروه قابل توجه است. اپی‌تلیوم ژرمینال (GE)، لومن (L)، فلش‌های دو طرفه در تصاویر a و b و c نمایانگر قطر لوله سمی نیفرس (std) هستند. سلول‌های لیدیک (LE)، پیکانها حفرات ایجاد شده در اپی‌تلیوم ژرمینال را نمایش می‌دهند. رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۲۰۰، بار: ۱۰۰ μm

جدول ۱. اثر عصاره هیدروالکلی لیپیدیوساتیوم و استریتوزوتوسین بر پارامترهای موفومتریکی لوله سمی نیفروس بیضه رت بالغ

گروه	قطر لوله سمی نیفروس μm	ضخامت اپی تلیوم ژر مینال μm	قطر لومن μm
کنترل نرمال	$258/4 \pm 16/74^b$	$95/6 \pm 6/87^b$	$150 \pm 9/35^b$
کنترل دیابتی	$216/4 \pm 12/36^a$	$70/80 \pm 4/65^a$	$109/80 \pm 8/25^a$
نرمال و دوز 200 mg/kg عصاره	$207 \pm 12/04^a$	$70/20 \pm 7/56^a$	$117/60 \pm 9/81^a$
نرمال و دوز 400 mg/kg عصاره	$208 \pm 19/84^a$	$77/50 \pm 6/12^a$	$113/00 \pm 7/54^a$
دیابتی و دوز 200 mg/kg عصاره	$188/0 \pm 13/91^{ab}$	$56/60 \pm 9/83^{ab}$	$126/40 \pm 14/77^a$
دیابتی و دوز 400 mg/kg عصاره	$180/40 \pm 8/26^{ab}$	$60/80 \pm 4/54^{ab}$	$119/60 \pm 8/79^a$

همه مقادیر بر اساس میانگین \pm انحراف معیار بیان شده اند، کلیه مقادیر بر اساس واحد میکرومتر است.

a: معنی دار با گروه کنترل $p < 0/001$ ، b: معنی دار با گروه کنترل دیابتی $p < 0/001$

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که درمان با عصاره لیپیدیوم ساتیوم به میزان 200 و 400 mg/kg و مدت 21 روز اثرات تخریبی بر روی اسپرماتوژن دارد و با کاهش اسپرماتوژن و پارامترهای کمی لوله های سمی نیفروس همراه است در نتیجه احتمالا می تواند فرد را در معرض اختلالات باروری قرار دهد. به عبارت دیگر دارای اثر توکسیک بر بافت بیضه می باشد. این که چرا LS باعث کاهش اسپر ماتوژن شده مشخص نیست. احتمالا به طور غیر مستقیم توانسته است محور هیپوفیز- گناد- هیپوتالاموسی hpg را تغییر می دهد که در تعاقب آن اسپرماتوژن تحت تاثیر قرار خواهد گرفت. در مطالعه Martinez و همکارانش در رتهایی که توسط استروئید درمانی هیپرپلازی پروستات در آنها القا شده بود با مصرف خوراکی *Lepidium latifolium* 0/86 mg/kg که دارای اثرات مشابهی با LS می باشد به مدت 6 ماه کاهش سایز پروستات در آنها مشاهده شد (19). Sharief مشاهده کرد که افزودن دانه *lepidium sativum* به رژیم غذایی موشهای ماده اثر ضد بارداری دارد (20) که اینها خود ناشی از تاثیر LS بر محور hpg می باشد، هر چند که در این مطالعه مقادیر گنادوتروپین های FSH و LH، را اندازه گیری شد. مکانیسم احتمالی دیگر در روند کاهش اسپرماتوژن در این مطالعه تاثیر مستقیم و توکسیک LS بر خود بافت بیضه می باشد. تحقیقات نشان داد که استرول ها، فلاونوئیدها، تانن ها، ساپونین، گلیکوزیدهای سیانوژنیک از جمله ترکیبات موجود در این گیاه می باشد (5). وجود 4 نوع فلاونوئید در عصاره دانه شاهی از جمله کوئرستین 3-5 دی بتا گلوکو پیرانوزیل گزارش شده است (21). چنین ترکیبات مشابهی در سایر گیاهان مانند گیاه سداب (22) و شوید (23) نیز وجود دارد. استفاده از سداب و شوید سبب آتروفی بیضه و کاهش تعداد اسپرم شده است (23). احتمال داده میشود که اثرات این گیاهان بر بافت بیضه به علت وجود کوئرستین و فلاونوئید می باشد. احتمالا کوئرستین و فلاونوئیدها موجب مهار همانند سازی DNA و کاهش سلول های اسپرماتوسیت می شود (22). همچنین mazaro نشان داده است که فیتو استرول ها سبب کاهش وزن بیضه ها و کاهش ذخیره اسپرم اپی دیدیم می شوند (24) بنابراین هر چند که عصاره LS می تواند دارای خواص هیپو گلیسمیک باشد و در انسانها نیز این خاصیت به خوبی نیز نشان داده شده است (25) ولیکن بر اسپرماتوژن اثرات نامناسی دارد.

در این مطالعه درمان با تک دوز 65 mg/kg استریتوزوتوسین نیز با کاهش روند اسپرماتوژن همراه بود. استریتوزوتوسین بدلیل القای دیابت منجر به تخریب

اسپرماتوژن می شود. که می تواند ناشی از تاثیر آن بر ترشح گنادوتروپینها باشد یا ناشی از افزایش میزان آسپه های اکسیداتیو استرسی سلولها بوده و یا ناشی از تغییرات مورفولوژیک بافت بیضه باشد که در این راستا نشان داده شده است استریتوزوتوسین باعث کاهش و کوچکتر شدن سلولهای لیدیگ می شود که سلولهای کلیدی در تولید هورمون تستوسترون و لازمه اسپرماتوژن هستند (27) و (15 و 26). نشان داده شد که کاهش انسولین در رت های دیابتی به طور مستقیم بر اپی تلیوم لوله های سمی نیفروس اثر ندارد و این اثر را بوسیله تغییر در سطح FSH سرم انجام می دهد. کاهش انسولین سبب کاهش سطح FSH می شود و کاهش FSH بر فعالیت اپی تلیوم لوله های سمی نیفروس اثر می گذارد (25). Bansal آتروفی سلولهای بیضه را از جمله مشکلات مردان دیابتی می داند (28 و 16).

در این مطالعه درمان ترکیبی عصاره LS در دوزهای 200 و 400 همراه با STZ نیز با تغییرات تخریبی شدیدتر در اسپرماتوژن همراه بود که با توجه به نتایج به دست آمده دور از انتظار نیز نبود. چرا که هم مصرف تنهایی عصاره و هم مصرف تنهای STZ خود باعث اختلال اسپرماتوژن شدند. بطور کلی نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد درمان با عصاره لیپیدیوم ساتیوم به میزان 200 و 400 mg/kg به مدت 21 روز اثرات تخریبی بر روی اسپرماتوژن دارد، درمان با تک دوز 65 mg/kg استریتوزوسین نیز خود با کاهش روند اسپر ماتوژن همراه است و درمان ترکیبی عصاره LS در دوزهای 200 و 400 همراه با 65 mg/kg استریتوزوسین باعث اختلال شدیدتر اسپرماتوژن می شود. به عبارت دیگر نه تنها LS اسپرماتوژن را در بیضه دیابتیک القاء شده با استریتوزوتوسین محافظت نمی کند بلکه اختلالات بیشتری را هم سبب می شود. شاید LS در دوزهای دیگر و پایین تر بتواند در برقراری بهتر اسپرماتوژن موثر باشد. لذا انجام آزمایشات دیگر در این راستا به صورت وابسته به دوز و یا وابسته به زمان و همچنین بررسی مکانیسم های مولکولی از جمله مواردی است که برای مطالعات بعدی پیشنهاد می شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه و رئیس مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان جهت تامین هزینه های مربوط به این تحقیق قدردانی و تشکر می گردد.

Study of the Protective Effect of *Lepidium Sativum* on Spermatogenesis in Diabetic Rat Testis Induced by Streptozotocin

M. Faghani (PhD)¹, F. Mohammadghasemi (PhD)^{1*}, G. Keiahi (MSc)²

1. Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

2. Education Department of Anzali, Guilan, Iran

J Babol Univ Med Sci; 15(2); Mar 2013; pp: 38-44

Received: Jun 10th 2012, Revised: Jul 4th 2012, Accepted: Aug 29th 2012.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: One of the side effects of diabete is subfertility. Diabete induces oxidative stress and cellular death in testis. *Lepidium sativum* is a plant with antidiabetic effects. The aim of this study was to investigate the protective effects of *lepidium sativum* (LS) extract on diabetic and injured rat testis induced by streptozotocin (STZ).

METHODS: In this experimental study, 36 adult rats were used. They were randomly divided into 6 groups. Group 1 (control) received normal saline. Groups 2 and 3 received 200 and 400 mg/kg, LS respectively. Group 4 received 65mg/kg, STZ for induction of diabetes. Groups 5 and 6 received 200 or 400 mg/kg LS plus STZ. STZ were administered in a single dose. LS extract and normal saline were administered once daily for 21 consecutive day. On the 22nd day after the experiment all animals were dissected and their testis were analyzed for histologic and morphometric studies.

FINDINGS: STZ induced spermatogenesis impairment and a significant decrease in germinal epithelial height $70.8 \pm 4.65 \mu$ compared to control $95.60 \pm 6.87 \mu$ ($p < 0.05$). Treatment with 200 and 400 mg/kg LS reduced germinal epithelial height to 70.20 ± 7.56 and $77.5 \pm 6.12 \mu$ respectively ($p < 0.05$).

CONCLUSION: Administration of LS in doses of 200 and 400 mg/kg for 21 days has toxic effects on testis. Therefore it cannot protect spermatogenesis in diabetic testis induced by STZ.

KEY WORDS: *Lepidium sativum*, *Histomorphometric*, *Spermatogenesis*, *Diabete*, *Streptozotocin*.

*Corresponding Author;

Address: Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

Tel: +98 131 6690099

E-mail: parsahistolab@gmail.com

References

- 1.Sharma S, Agarwal N. Nourishing and healing prowess of garden cress (*lipidium sativum* linn.)- A review. *Indian J Nat Prod Resour* 2011;2(3):292-7.
- 2.Maier UH, Gundlach H, Zenk MH. Seven imidazole alkaloids from *lepidium sativum*. *Phytochemistry* 1998;49(6): 1791-5.
- 3.O'Neill ME, Carroll Y, Corridan B, et al. A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *Br J Nutr* 2001;85(4):499-507.
- 4.Jouad H, Haloui M, Rhiouani H, El Hilaly J, Eddouks M. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal disease in north centre region of morocco (fez_boulemane). *J Ethnopharmacol* 2001; 77(2-3):175-82.
- 5.Patel U, Kulkarni M, Undale V, Bhosale A. Evaluation of diuretic activity of aqueous and methanol extracts of *lepidium sativum* garden cress (cruciferae) in rats. *Trop J Pharm Res* 2009;8(3):215-9.
- 6.Eddouks M, Maghrani M, Zeggwagh NA, Michel JB. Study of the hypoglycaemic activity of *Lepidium sativum* L. aqueous extract in normal and diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2005;97(2):391-5.
- 7.Afaf IA, Nuha H, Mohammed AH. Hepatoprotective effect of *lepidium sativum* against carbon tetrachloride induced damage in rats. *Res J Anim Vet Sci* 2008;3:20-3.
- 8.Rehman NU, Khan AU, Alkharfy KM, Gilani AH. Pharmacological Basis for the Medicinal Use of *Lepidium sativum* in Airways Disorders. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012;2012:596524. Epub 2012 Jan 15.
- 9.Brennan P, Hsu CC, Moullan N, et al. Effect of cruciferous vegetables on lung cancer in patients stratified by genetic status: a mendelian randomisation approach. *Lancet* 2005; 366 (9496):1558-60.
- 10.Slattey ML, Benson J, Curtin K, Ma KN, Schaeffer D, Potter JD. Carotenoids and colon cancer. *Am J Clin Nutr* 2000;71(2):575-82.
- 11.Brown LM, Gridley G, Pottern LM, et al. Diet and nutrition as risk factors for multiple myeloma among blacks and whites in the United States. *Cancer Causes Control* 2001;12(2):117-25.
- 12.Chu YF, Wu X, liu RH. Antioxidant and anti proliferative activities of common vegetables. *J Agric food chem* 2002;50(23):6910-6.
- 13.Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27(5):1047-53.
- 14.Roghani M, Baluchnejadmojarad T, Roghani-Dehkordi F. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effect of chronic administration of hesperetin in diabetic rats. *J Babol Univ Sci* 2010;12(4):21-6. [in Persian]
- 15.Ricci G, Catizone A, Esposito R, Pisanti FA, Vietri MT, Galdieri M. Diabetic rat testes: morphological and functional alterations. *Andrologia* 2009;41(6):361-8.
- 16.Mallidis C, Green BD, Rogers D, et al. Metabolic profile changes in the testes of mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus. *Int J Androl* 2009;32(2):156-65.
- 17.Zhao Y, Tan Y, Dai J, Li B, et al. Exacerbation of diabetes-induced testicular apoptosis by zinc deficiency is most likely associated with oxidative stress, p38 MAPK activation, and p53 activation in mice. *Toxicol Lett* 2011;200(1-2):100-6.
18. Rezaei Aref T, Minaii Zangii B, latifpour M. Protective effect of *Urtica Dioica* extract on the damage of rat small intestinal mucosa causes by diabetes. *J Babol Univ Sci* 2012;14(3):31-7. [in Persian]
19. Martínez Caballero S, Carricajo Fernández C, Pérez-Fernández R. Effect of an integral suspension of *Lepidium latifolium* on prostate hyperplasia in rats. *Fitoterapia* 2004;75(2):187-91.
- 20.Sharief M, Gani ZH. Garden cress *lepidium sativum* seeds as oral contraceptive plant in mice. *Saudi Med J* 2004; 25(7):965-6.

21. Agarwal J, Verma DL. Antioxidative Activity and Flavonoid Composition from *Lepidium sativum*. *Nat Sci* 2011; 9(7):21-5.
22. Ahmadi A, Nasiri Nejad F, Parivar K. Effect of aqueous extract of the aerial part of the *Ruta Graveolens* on the spermatogenesis of immature balb/C mice. *Razi J Med Sci* 2007;14(56):13-20. [in Persian]
23. Roessner C, Paasch U, Kratzsch J, Glander HJ, Grunewald S. Sperm apoptosis signalling in diabetic men. *Reprod Biomed Online* 2012;25(3):292-9.
24. Mazaro R, Di Stasi LC, Filho SA, De Grava Kempinas W. Decrease in sperm number after treatment of rats with *Austroplenckia populnea*. *Contraception* 2000;62(1):45-50.
25. Shukla A, Bigoniya P, Srivastava B. Hypoglycemic activity of *lepidium sativum* linn seed total alkaloid on alloxan induced diabetic rats. *Res J Med Plant* 2012;6(8):587-96.
26. Ballester J, Muñoz MC, Domínguez J, Rigau T, Guinovart JJ, Rodríguez-Gil JE. Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH- and LH-linked mechanisms. *J Androl* 2004;25(5):706-19.
27. Amaral S, Mota PC, Lacerda B, et al. Testicular mitochondrial alterations in untreated streptozotocin-induced diabetic rats. *Mitochondrion* 2009;9(1):41-50.
28. Bansal TC, Guay AT, Jacobson J, Woods BO, Nesto RW. Incidence of metabolic syndrome and insulin resistance in a population with organic erectile dysfunction. *J Sex Med* 2005;2(1):96-103.