Cell and Tissue Journal 14(4) (2023) 325-336

Journal of Cell and Tissue
http://jct.araku.ac.ir

Evaluation of Histomorphology and Spermatogenic Indices in Diabetic Rats Treated with *Ferula assa-foetida L.* Oleo Gum Resin Extract.

Asadollahi Z[a], Mohammadpour AA [b*], Latifi E[c], Nourani H[d]

[a] Ph.D Student, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Postcode 9177948974, Iran

[b] Professor, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Postcode 9177948974, Iran

[C] Ph.D, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Postcode 9177948974, Iran

[d] Associated Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Postcode 9177948974, Iran

Original Article

Use your devi ce to scan and read the article online

Citation: Asadollahi Z, Mohammadpour A A, Latifi E, Nourani H._Evaluation of Histomorphology and Spermatogenic Indices in Diabetic Rats Treated with Ferula assa-foetida L. Oleo Gum Resin Extract. Journal of Cell and Tissue.

https://10.61186/JCT.14.4.325

KEYWORDS

Histomorphology
Ferula assa-foetida L.
Diabetes
Rat testis
Spermatogenic indices

ABSTRACT

Aim: For many years, medicinal plants have been used to treat many diseases, including diabetes and its side effects, due to their natural and antioxidant compounds. One of these systems that suffers from the complications of diabetes is the reproductive system. Many researches have been conducted to investigate the effectiveness of different medicinal plants on the reproductive system. In this study, the effect of *Ferula assa-foetida L.* gum extract on the spermatogenesis indices and testicular tissue structure of diabetic male Wistar rats was investigated.

Material and Methods: In our study, 42 male Wistar rats were divided into 6 groups. Diabetes induced by a single dose of streptozotocin (55 mg/kg body weight). Evaluation of the effect of *Ferula assa-foetida L.* oleo gum extract was done by treating animals with gum extract (150 and 250 mg/kg b. w, gavage) for 42 days. After this period, the animals were anesthetized and sacrificed. After this period, the animals were anesthetized and sacrificed. Then the testicular tissue sampling was done and the samples were fixed in 10% formalin, then the preparation steps of the microscopic sections were performed included 1-dehydration, 2-clarification, 3-smearing, 5-paraffin molding, 6- Cutting with a microtome machine, 7- sticking the samples on a

* Corresponding author. Tel.: 051 38805636
E-mail address: mohammadpoor@um.ac.ir
DOI: https://10.61186/JCT.14.4.325
Received: 21 Oct. 2023; Received in revised form: 19 Dec. 2023; Accepted: 20 Dec. 2023
Original Article
©Author

slide, 8- staining with hematoxylin and eosin, 9- mounting. Finally, the samples were prepared for microscopic study. The number of germinal epithelium cells of spermatogenic tubules was counted and Spermiogenesis Index (SI), Tubular Differentiation Index (TDI), Meiosis Index (MI) and Sertoli Cell Index (SCI) were measured.

Results: Results showed that Ferula assa-foetida L. oleo gum extract improves the tissue damages of diabetes on testicular tissue and spermatogenesis indices.

Conclusion: *Ferula assa-foetida L.* oleo gum extract reduces testicular tissue damage caused by diabetes and has an improving effect on spermatogenesis and fertility disorders related to diabetes.

سلول و بافت، دوره ۱۴، شماره ۴، سال ۱۴۰۲، صفحات ۳۲۵ تا ۳۳۶

سلول و بافت

ارزیابی هیستومورفولوژی و شاخص‌های اسپرماتوژنز در رت‌های دیابتی تیمار شده با عصاره‌ی صمغ آنغوزه (*Ferula assa-foetida L*)

زهرا اسداللهی[۱]، احمدعلی محمدپور[۲*]، ابراهیم لطیفی[۳]، حسین نورانی[۴]

[۱] دانشجوی دکتری، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد،کد پستی ۹۱۷۷۹۴۸۹۷۴، ایران. zahra.asadollahi@gmail.com

[۲] استاد، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه فردوسی، مشهد، کد پستی ۹۱۷۷۹۴۸۹۷۴، ایران. mohammadpoor@um.ac.ir

[۳] دکتری تخصصی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی، مشهد، کد پستی ۹۱۷۷۹۴۸۹۷۴، ایران ebrahim.latifi@alumni.um.ac.ir

[۴] دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی، مشهد، کد پستی ۹۱۷۷۹۴۸۹۷۴، ایران nourani@um.ac.ir

واژگان کلیدی

هیستومورفولوژی
آنغوزه
دیابت
بیضهٔ رت
شاخص های اسپرماتوژنز

تاریخ دریافت:۱۴۰۲/۰۷/۲۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۹

چکیده

هدف: گیاهان دارویی به‌دلیل داشتن ترکیبات طبیعی و آنتی اکسیدانتی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله دیابت و عوارض جانبی ناشی از آن مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از سیستم‌هایی که تحت تاثیر دیابت قرار می‌گیرد دستگاه تناسلی می‌باشد و بیضه‌ها به‌عنوان غدد اصلی این سیستم تحت تاثیر دیابت قرار گرفته و دچار اختلال می‌شوند. در این مطالعه تاثیر عصاره‌ی صمغ آنغوزه بر شاخص‌های اسپرماتوژنز و ساختار بافتی بیضه موش‌های صحرایی نر دیابتی نژاد ویستار بررسی شد. **مواد و روش‌ها:** ۴۲ سر رت نژاد ویستار به ۶ گروه تقسیم شدند. برای القای دیابت، حیوانات یک دوز استرپتوزوتوسین (۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوانات) دریافت کردند. جهت ارزیابی اثر عصاره صمغ آنغوزه تیمار حیوانات دیابتی با عصاره صمغ آنغوزه در مقادیر ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی گرم /کیلوگرم وزن بدن موش صحرایی با استفاده از سرنگ گاواژ و به‌مدت ۴۲ روز انجام شد. پس از این مدت حیوانات بی‌هوش و آسان کشی شدند. سپس نمونه برداری از بافت بیضه انجام شد و نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد و بوئن فیکس شدند. مراحل آماده سازی مقاطع میکروسکوپی شامل ۱- آبگیری، ۲- شفاف سازی، ۳- آغشته کردن، ۵- قالب گیری با پارافین، ۶- برش با دستگاه میکروتوم، ۷- چسباندن نمونه‌ها بر روی لام، ۸- رنگ آمیزی با رنگ هماتوکسیلین – ائوزین و ماسون-تری کروم، ۹- مونته کردن انجام شد. در نهایت نمونه‌ها جهت مطالعه میکروسکوپی آماده شدند. تعداد سلول‌های اپی‌تلیوم زایای لوله‌های اسپرم ساز شمارش شده و سپس ضریب اسپرمیوژنز، ضریب تمایز لوله ای، ضریب میوزی و ضریب سلول سرتولی محاسبه شد. نتایج: داده‌ها و تجزیه و تحلیل آماری این مطالعه بر اثر مثبت عصاره صمغ آنغوزه بر اسپرم زایی و اختلالات باروری مرتبط با دیابت تاکید دارد. **نتیجه گیری:** عصاره صمغ آنغوزه آسیب‌های بافتی دیابت بر بافت بیضه را کاهش می‌دهد و بر اسپرم زایی و اختلالات باروری مرتبط با دیابت اثر بهبود دهنده دارد.

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۵۱۳۸۸۰۵۶۳۶

آدرس پست الکترونیک: mohammadpoor@um.ac.ir

۱- مقدمه

امروزه گیاهان دارویی و ترکیبات طبیعی به‌دلیل داشتن عوارض کمتر نسبت به داروهای شیمیایی در درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد توجه قرار می‌گیرند. یکی از سیستم‌هایی که از قدیم در طب سنتی مورد توجه بوده، دستگاه تناسلی است. اثرات گیاهان دارویی بر سیستم تولید مثلی مانند کورکومین(Curcumin) (۱)، فیکوس کاریکا (Ficus Carica)(۲)، تلفریا اوکسیدنتالیس(Telferia Occidentalis) (۳)، زنجبیل(Ginger) (۴) و بسیاری گیاهان دارویی دیگر توسط محققان بررسی شده است. یکی دیگر از گیاهان دارویی که از دیرباز مورد مطالعه قرار گرفته و در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله اختلالات عصبی، معده درد، انگل‌های روده، ضعف هضم، آسم، برونشیت، آنفولانزا، ناباروری و دیابت سال‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵و۶و۷) گیاه آنغوزه (*Ferula assa-foetida L.*) است. این گیاه بومی ایران و از خانواده Apiaceae است. بسیاری از آنتی اکسیدانت‌ها و ترکیبات فعال طبیعی در آنغوزه شناسایی شده اند، از جمله ترکیبات شناسایی شده در آنغوزه اسید فرولیک(Ferulic acid)، استرها (esters)، کومارین‌ها (coumarins) و سایر ترپنوئیدها (terpenoids)، گلوکز(glucose)، گالاکتوز (galactose)، ال آرابینوز (L-arabinose)، رامنوز (rhamnose)، گلوکورونیک اسید(glucuronic acid)، پلی ساکاریدهای گلیکوپروتئین(polysaccharides glycoprotein)(۵)، آمبلی فرون (umbelliferone)(۸)، α-پینن (α-pinene)، β-پینن (β-pinene)، ژرماکرن B(germacrene B)، میرسنmyrcene()، لیمونن(limonene) (۹)، بیزابولول (bisabolol) و کوئرستین(quercetin)(۱۰) می‌باشند. همچنین یکی از شایع‌ترین بیماری‌های متابولیک که بسیاری از افراد در جهان از آن رنج می‌برند دیابت است. دیابت عوارض زیادی بر سایر بافت ها و اندام‌های بدن از جمله سیستم تناسلی دارد (۱۰). تحقیقات زیادی در رابطه با اثر بخشی گیاهان دارویی مختلف بر دیابت و عوارض جانبی آن انجام شده است (۱۱و۱۲). با توجه به اثرات منفی دیابت بر بیضه‌ها و اثرات مثبت گیاهان دارویی بر دیابت و دستگاه تناسلی، در این تحقیق بر آن شدیم تا اثر عصاره هیدروالکلی صمغ آنغوزه را بر اسپرماتوژنز و بافت بیضه بررسی کنیم.

۲- مواد و روش‌ها

حیوانات: در این مطالعه تجربی ۴۲ سر رت نر نژاد ویستار ۳ ماهه با وزن ۲۰±۲۷۰ گرم استفاده شد. حیوانات از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی تهیه شدند و به‌منظور سازگاری با محیط، به‌مدت دو هفته قبل از شروع آزمایش در شرایط استاندارد شامل دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و چرخه نور: تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در آزمایشگاه نگه‌داری شدند. در طول آزمایش و قبل از آن، حیوانات به آب و غذا دسترسی آزاد داشتند. طبق توصیه هایACEC ، تلاش شد تا درد و رنج حیوانات در طی روند آزمایش به حداقل برسد.

داروها: برای القای دیابت از استرپتوزوتوسین (استرپتوزوتوسین، سیگما آلدریچ، ایالات متحده آمریکا) و برای درمان دیابت از متفورمین (متفورمین، مرک، آلمان) به‌عنوان مرجع استفاده شد.

القای دیابت: القای دیابت با استفاده از یک دوز STZ (۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، داخل صفاقی) (۱۳) انجام شد و بعد از ۷۲ ساعت قند خون به‌مدت ۱۰ روز متوالی اندازه گیری شد و حیوان با سطح FBS بالاتر از ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی لیتر به‌عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند (۱۴) و حیوانات دیابتی شده در مطالعه ما مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه عصاره اتانولی صمغ آنغوزه: ۱۰۰ گرم پودر صمغ آنغوزه در ۱۰۰۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درجه حل شد و سپس به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق نگه‌داری شد. پس از ۴۸ ساعت، محلول ۴ بار با کاغذ صافی (درجه ۴۰) صاف شد و سپس در خشک کن چرخشی خشک و در یخ خشک منجمد شد. سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره و نگه‌داری شد.

گروه بندی حیوانات: در این مطالعه ۴۲ سر رت نر نژاد ویستار به ۶ گروه تقسیم شدند: ۱) گروه اول (کنترل غیردیابتی یا ک-غ): هیچ دارویی دریافت نکردند اما حجم مشخصی از آب مقطر (حلال دارو) را به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌وسیله سرنگ گاواژ دریافت کردند، ۲) گروه دوم (کنترل دیابتی یا ک-د): حیوانات این گروه دیابتی شده و در طول دوره آزمایش مانند گروه کنترل حجم مشخصی آب مقطر (حلال دارو) را به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن به وسیله سرنگ گاواژ دریافت کردند. ۳) گروه سوم (آنغوزه ۱۵۰ یا آ۱۵۰): حیوانات این گروه دیابتی نشدند و در طول دوره آزمایش فقط مقدار ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره صمغ آنغوزه را به‌وسیله سرنگ گاواژ دریافت کردند. ۴)گروه چهارم (دیابتی+ آنغوزه۱۵۰ یا د+آ۱۵۰): حیوانات این گروه دیابتی شده ودر طول دوره آزمایش مقدار ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره آنغوزه را به‌وسیله سرنگ گاواژ دریافت کردند ، ۵) گروه پنجم (دیابتی+ آنغوزه ۲۵۰ یا د+آ۲۵۰): حیوانات این گروه دیابتی شده و در طول دوره آزمایش مقدار ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره آنغوزه را به‌وسیله سرنگ گاواژ دریافت کردند. ۶) گروه ششم(دیابتی+ متفورمین یا د+م): حیوانات این گروه دیابتی شده و مقدار ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن متفورمین را به‌وسیله سرنگ گاواژ (۱۵،۱۶،۱۷) دریافت کردند.

نمونه برداری و پردازش بافت: نمونه برداری پس از ۴۲ روز درمان با عصاره صمغ آنغوزه انجام شد. حیوانات بی‌هوش و آسان کشی شدند. سپس بیضه‌ها جدا شده و با نرمال سالین شسته شدند. تثبیت در فرمالین۱۰ درصد و بوئن انجام شد. سپس آبگیری با استفاده از غلظت‌های صعودی اتانول انجام شد.در مرحله بعد نمونه ها ابتدا با ترکیب گزیلول و روغن صدر و سپس به‌وسیله گزیلول خالص شفاف سازی شدندو سپس با پارافین با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد آغشته شدند و سپس وارد دستگاه پاساز بافت شدند. پاساژ بافتی در دستگاه اتوتکنیکون شرکت دید سبز انجام شد. سپس نمونه‌ها با پارافین قالب‌گیری شدند. بعد به‌وسیله دستگاه میکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد و این برش‌ها با چسب آلبومین بر روی لام‌ها فیکس شدند. سپس لام‌های آماده شده به‌وسیله‌ی رنگ هماتوکسیلین و ائوزین و ماسون-تریکروم رنگ آمیزی و سپس به‌وسیله‌ی چسب و لامل مونته شده و برای مطالعه میکروسکوپی و تهیه عکس های رنگی از نمونه‌ها آماده شدند.

ارزیابی اسپرماتوژنز: برای مطالعه تاثیر عصاره صمغ آنغوزه بر اسپرماتوژنز، فراوانی سلول‌ها در مراحل مختلف تمایز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سلول‌های سرتولی، اسپرماتوگونی، اسپرماتیدهای گرد و اسپرماتوسیت‌های اولیه بر اساس مورفولوژی و موقعیت آن‌ها در لوله اسپرم ساز شناسایی شدند (شکل ۱). سلول‌های اسپرماتوگونی سلول‌های گرد کوچکی با هسته تیره و بیضی شکل هستند که در غشای پایه لوله‌های اسپرم ساز قرار دارند. سلول‌های سرتولی دارای هسته روشن و بیضی شکل و اغلب با هسته بزرگ هستند و در غشای پایه بین اسپرماتوگونی‌ها قرار دارند. اسپرماتوسیت‌های اولیه واقع در لایه سلولی مجرای اسپرماتوگونی هستند و توسط پل سیتوپلاسمی به یکدیگر متصل می‌شوند و بزرگ‌تر از اسپرماتوگونی با هسته مشخص شده هستند. اسپرماتیدهای گرد سلول‌هایی با هسته روشن هستند و در قسمت مجرای اپی‌تلیوم اسپرم ساز یافت می‌شوند. در مجموع ۱۰۰ لوله برای هر نمونه مشاهده شد. درصد لوله‌های اسپرم ساز با بیش از سه رده سلول تمایز یافته، به‌عنوان ضریب تمایز لوله‌ای (TDI)گزارش شده است (جدول ۱). شاخص اسپرمیوژنز (SPI) به‌صورت درصد لوله‌های اسپرم

ساز با اسپرم‌زایی طبیعی محاسبه شد (جدول ۱). ضریب میوزی(MI) به‌صورت نسبت تعداد اسپرماتیدهای گرد به اسپرماتوسیت های اولیه محاسبه شد (جدول ۱). ضریب سلول سرتولی (SCI) به‌صورت نسبت تعداد سلول‌های زایا به تعداد سلول سرتولی در هر لوله اسپرم ساز محاسبه شد.

جدول۱: اثر عصاره صمغ آنغوزه بر شاخص های اسپرماتوژنز رتهای دیابتی و غیر دیابتی

گروه ها	اسپرماتوگونی	اسپرماتوسیتI	اسپرماتید گرد	سلول سرتولی
ک-غ	۵۸.۳۳±۵.۱۵	۷۷.۰۰±۱.۰۹	۱۸۷.۵۰±۲۴.۸۲	۴۸.۱۶±۶.۰۰
ک-د	۱۲.۶±۱.۲۸*†‡⊕	۴۲.۶۰±۵,۴۰†‡*⊕	۲۱,۲۰±۴,۶۱†‡*⊕	۱۵,۶۰±۳,۱۰*†‡⊕
آ۱۵۰	۵۰,۶۰±۱,۸۸	۸۹,۸۰ ±۴,۶۳	۱۳۳.۶۰±۷.۳۹⊕	۴۲.۶۰±۲.۰۳
د+آ۱۵۰	۴۹.۰۰±۱.۴۴	۷۱.۲۰±۳.۴۱	۱۴۵.۲۰±۷.۰۸	۴۰.۰۰±۱.۱۴
د+آ۲۵۰	۱۹.۳۳±۱.۵۶*†‡⊕	۴۳.۳۳±۶.۷۹*†‡⊕	۷۰.۳۳±۵.۵۸*†‡⊕	۱۹.۳۳±۳.۱۰*†‡⊕
د+م	۴۶,۸۰±۶,۰۵	۸۴,۶۰±۱۱,۰۵	۲۰۵.۰۰±۱۷.۲۲	۴۴.۰۰±۲.۶۸

اثر عصاره صمغ آنغوزه بر تعداد سلول‌ها در مراحل مختلف تمایز سلولی در طی اسپرماتوزنز در رت‌های دیابتی شده.

داده‌ها مقادیر میانگین ± SEM هستند; آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست توکی انجام شد;$p< 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌دار بودن داده‌ها در نظر گرفته شد;*، اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل غیردیابتی(ک-غ); #، اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل دیابتی(ک-د); †، اختلاف معنی‌دار با گروه غیردیابتی تیمار شده با عصاره صمغ آنغوزه (۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوانات) (آ۱۵۰); ‡، اختلاف معنی‌دار با گروه دیابتی تیمار شده با عصاره صمغ آنغوزه(۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوانات)(د+آ۱۵۰); ¤، اختلاف معنی‌دار با گروه دیابتی تیمار شده با عصاره صمغ آنغوزه(۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوانات)(د+آ۲۵۰); ⊕،اختلاف معنی دار با گروه دیابتی تیمار شده با متفورمین (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوانات)(د+ م).

۳- آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۲) و با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی‌داری داده‌ها $p\leq0.05$ در نظر گرفته شد و داده‌ها به‌صورت مقادیر میانگین ± SEM گزارش شد.

۴- نتایج

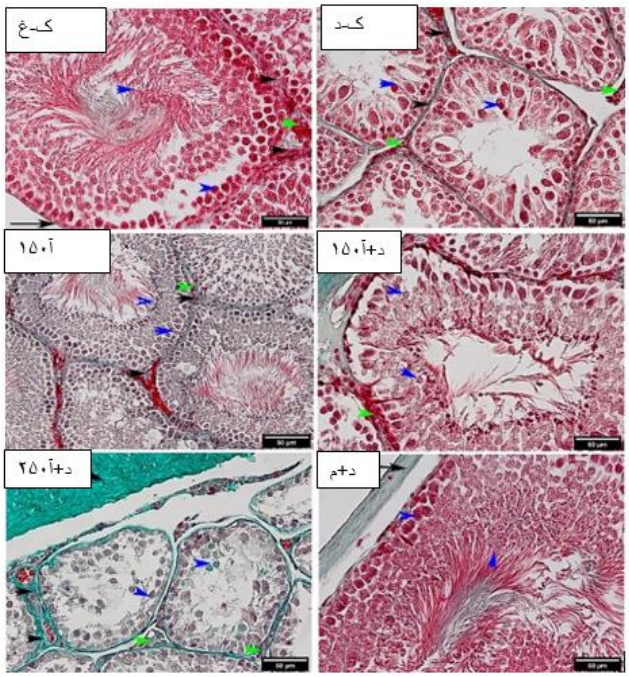
تعداد سلول

شمارش سلولی در لوله‌های اسپرم ساز با نرم افزار ImageJ انجام شد و اسپرماتوگونی ها، اسپرماتوسیت های اولیه، اسپرماتیدهای گرد و سلول‌های سرتولی شمارش شدند (شکل ۱.ب).

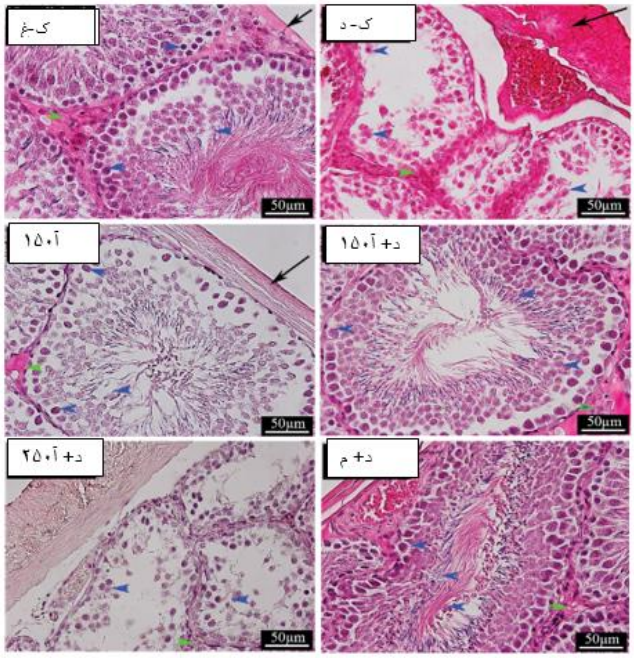
اسپرماتوسیت اولیه

نتایج تجزیه و تحلیل تعداد اسپرماتوسیت‌های اولیه نشان داد که تعداد این سلول‌ها در گروه‌های ک-غ، آ۱۵۰، د+آ۱۵۰ و د+م نسبت به گروه ک-د و د+آ۲۵۰ افزایش معنی‌داری داشت. وجود تفاوت معنی‌دار در گروه‌های د+آ۱۵۰ و د+م نسبت به گروه ک-د و گروه د+آ۲۵۰ نشان می‌دهد که درمان موش‌های دیابتی با دوز پایین عصاره صمغ آنغوزه (گروه د+آ۱۵۰)و متفورمین (گروه د+م) تاثیر مثبتی بر حفظ و بازیابی این سلول ها داشته است (شکل۱.الف و ب).

الف.



ب.



شکل ۱: اثر عصاره صمغ آنغوزه بر تعداد سلول ها در مراحل مختلف تمایز سلولی در طی اسپرماتوزنز در رت‌های دیابتی شده.

الف-تصاویر میکروسکوپ نوری از مقاطع بیضه رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین- ائوزین (H&E: Hematoxylin and Eosin) و ماسون تری کروم (Masson Tri- chrome)از گروه های مختلف مورد آزمایش. پیکان سیاه نشان دهنده تونیک آلبوژینه(Tunica Albuginea :TA) ، پیکان سبز نشان دهنده اسپرماتوگونی(SG: Spermatogonia) ،پیکان آبی نشان دهنده اسپرماتید گرد(RS:Round Spermatid). ب.داده ها نشان دهنده تعداد اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتوگونی، اسپرماتید گرد و سلول سرتولی در گروه‌های مختلف آزمایش است.

اسپرماتوگونی

نتایج به‌دست آمده نشان داد که تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه‌های آ۱۵۰، د+آ۱۵۰ ، د+م نسبت به گروه‌های ک-د و د+آ۲۵۰ افزایش معنی‌داری داشت. این نشان می‌دهد که آنغوزه بر حفظ و بهبود سلول‌های اسپرماتوگونی در بیضه حیوانات دیابتی و غیر دیابتی اثر مثبت دارد. عدم وجود تفاوت معنی‌دار در گروه‌های آ-۱۵۰، د+آ۱۵۰ و د+م بر نقش مثبت عصاره صمغ آنغوزه در بهبود و حفظ ساختار بافتی بیضه تاکید می‌کند (شکل ۱.الف و ب).

اسپرماتید گرد

شمارش اسپرماتیدهای گرد نشان داد که گروه آ۱۵۰، د+آ۱۵۰ و د+م تفاوت معنی‌داری با گروه‌های ک-د و د+آ۲۵۰ دارند. داده‌های گروه ک-د نشان می‌دهد که دیابت بر تعداد اسپرماتیدهای گرد اثر منفی دارد و همچنین داده‌های گروه د+آ۲۵۰ نشان می‌دهد که دوز بالای عصاره‌ی صمغ آنغوزه عوارض ناشی از دیابت را بهبود نداده و بر تعداد اسپرماتیدهای گرد اثر منفی دارد (شکل ۱.الف و ب).

سلول سرتولی

داده‌های مطالعه ما نشان داد که تعداد سلول‌های سرتولی در گروه‌های آ۱۵۰، د+آ۱۵۰ و د+م در مقایسه با گروه‌های ک-د و د+آ۲۵۰ به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است (شکل ۱.الف و ب).

ارزیابی اسپرماتوژنز

برای ارزیابی اسپرماتوژنز، چندین شاخص محاسبه شد تا مشخص شود دیابت، عصاره صمغ آنغوزه و متفورمین بر دستگاه تناسلی تأثیر دارند یا خیر؟ برای این منظور ضریب سلول سرتولی، ضریب تمایز لوله ای، ضریب میوزی و ضریب اسپرمیوژنز محاسبه شد (جدول ۱).

ضریب میوزی

داده های به‌دست آمده از مطالعه ما نشان داد که ضریب میوزی در گروه ک-د نسبت به گروه‌های ک-غ، د+آ۱۵۰، د+آ۲۵۰ و د+م کاهش معنی داری داشته است (جدول ۱).

ضریب اسپرمیوژنز

نتایج مطالعه ما نشان داد که ضریب اسپرمیوژنز در گروه‌های ک-د و د+آ۲۵۰ نسبت به گروه های ک-غ، آ۱۵۰، د+آ۱۵۰ و د+م کاهش معنی داری داشته است (جدول ۱). این نتایج بر اثرات مضر دیابت و دوزهای بالای عصاره صمغ آنغوزه (۲۵۰ میلی گرم) در مقایسه با دوزهای پایین(۱۵۰ میلی‌گرم) آن تاکید دارد. همچنین تفاوت معنی داری بین گروه‌های آ۱۵۰ و د+آ۱۵۰ وجود ندارد که نشان دهنده تأثیر مثبت دوز پایین عصاره صمغ آنغوزه بر ساختار بیضه موش‌های صحرایی دیابتی و غیر دیابتی باشد عصاره صمغ آنغوزه اثرات مخرب دیابت بر بافت بیضه را بهبود می‌بخشد.

ضریب تمایز لوله ای

نتایج نشان داد که بین گروه‌های ک-د و د+آ۲۵۰ با سایر گروه ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱). وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های ک-د و د+آ۱۵۰ نشان دهنده تاثیر دوز پایین عصاره صمغ آنغوزه (۱۵۰ میلی‌گرم) در کم کردن آسیب‌های بافتی ناشی از دیابت است.

ضریب سلول سرتولی

مقایسه مقادیر به‌دست آمده از مطالعه ما نشان داد که بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (جدول ۱).

۵- بحث

آنغوزه یک گیاه دارویی شناخته شده است که در طب سنتی ایران، هند، برزیل و امریکا به‌عنوان یک داروی دارای خاصیت آفوردیزیاک بر سیستم تولید مثلی مذکر استفاده شده است (۵و۶). اگر چه اثر بخشی گونه‌های مختلف گیاه آنغوزه به‌عنوان یک داروی محرک جنسی بررسی شده است اما تا کنون تحقیقات کمی در مورد اثرات آنغوزه بر ساختار و هیستولوژی دستگاه تناسلی انجام شده است. با توجه به اثرات منفی دیابت بر دستگاه تناسلی نر و بافت بیضه در این مطالعه اثرات گیاه آنغوزه بر هیستولوژی بیضه و شاخص‌های اسپرم زایی در رت‌های دیابتی و غیر دیابتی بررسی شد.

نتایج مطالعه ما نشان می‌دهد که دیابت باعث کاهش تعداد سلول اسپرماتوسیت، اسپرماتوگونی، اسپرماتید گرد و سلول سرتولی در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل شده است. همچنین ضریب اسپرمیوژنز و ضریب تمایز توبولی در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل غیر دیابتی کاهش یافته است. مطالعات نشان داده که دیابت باعث کاهش تعداد سلول‌های اپی‌تلیوم زایشی بیضه و ضرایب اسپرم زایی می‌شود (۲۰). افزایش سطح گلوکز خون در دیابت منجر به اکسیداسیون گلوکز، ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن، استرس اکسیداتیو (۱۸) و مرگ برنامه ریزی شده سلول می‌شود (۱۹). این رویدادها می‌تواند منجر به آسیب بافتی و عملکردی در بیضه‌ها شود. همان‌طور که در مطالعات پیشین گسستگی اسپرم زایی و تغییرات مورفولوژیکی فضای میان بافتی بیضه در موش‌های صحرایی دیابتی (۲۲-۲۲) و کاهش تعداد سلول‌های زایا و اندازه لوله‌های اسپرم ساز و افزایش تعداد لوله‌های اسپرم ساز در شرایط دیابت مشاهده شده (۲۳) که این آسیب‌های بافتی بیضه در تصاویر ثبت شده از آزمایش ما در گروه کنترل دیابتی مشاهده می‌شود. در این مطالعه اثرات عصاره صمغ آنغوزه به‌عنوان یک ترکیب حاوی آنتی اکسیدانت‌های طبیعی بر روی اسپرم زایی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که دوز پایین عصاره صمغ آنغوزه (۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوانات) می‌تواند اثرات مثبتی بر تعداد سلول‌های زایا و تمایز آن‌ها در طی فرآیند اسپرم زایی در لوله های اسپرم زایی داشته باشد.

در مطالعه باقری و همکاران (۶)، اثر مثبت عصاره صمغ آنغوزه بر روند اسپرم زایی گزارش شده است، آنها نشان دادند که با افزایش دوز عصاره میزان هورمون تستوسترون افزایش می‌یابد، اگرچه برخی از سلول‌های لایدیگ واکوئله می‌شوند اما افزایش دوز عصاره باعث کاهش اسپرم زایی نمی‌شود. همچنین افزایش دوز عصاره سبب بهبود جانسون اسکور می شود.

همچنین در مطالعه ایوبی و همکاران (۲۴) اثر دوزهای مختلف عصاره آنغوزه بر بیضه رت‌ها بررسی شد و نتایج نشان داد که با افزایش دوز عصاره تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت و لایدیگ و سرتولی کاهش یافته و همچنین دوزهای بالاتر از ۱۵۰ میلی گرم

عصاره صمغ آنغوزه باعث تخریب بافت زایای اسپرم می‌شود. در مطالعه ما نیز دوز پایین عصاره صمغ آنغوزه اثرات بهبود دهنده بر سلول‌های اپی‌تلیوم زایا و ضرایب اسپرماتوژنز در لوله‌های اسپرم ساز موش‌های دیابتی دارد. اما دوز بالای عصاره صمغ آنغوزه باعث تخریب بافت بیضه و اپی‌تلیوم زایا می‌شود. عصاره آنغوزه حاوی ترکیبات استروژنیک از جمله کومارین‌ها می باشد (۵) که این ترکیبات باعث گسستگی فرآیند اسپرم سازی، کاهش تراکم سلول‌های بافت اسپرم ساز و افزایش قطر لومن لوله‌های اسپرم ساز می‌شوند (۲۵). وجود مقادیر بالای ترکیبات آنتی اکسیدانتی در دوزهای بالا ممکن است بر سیالیت غشا اثر گذاشته و سبب بر هم خوردن تعادل غشایی رادیکال‌های آزاد شود که این عامل هم ممکن است در فرآیند اسپرماتوژنز اختلال ایجاد کند (۲۶). در مطالعه ما نیز کاهش تراکم سلولی در اپی‌تلیوم زایای لوله‌های اسپرم ساز در گروه د+آ۲۵۰ مشاهده می‌شود. علاوه براین، دوزهای پایین فرولیک اسید در کاهش گلوکز خون موش‌های دیابتی نسبت به دوزهای بالا موثرتر است که توسط بالاسوباشینی و همکاران (۲۷) اخلاقی و همکاران (۲۸)، در ترکیب عصاره صمغ آنغوزه آنتی اکسیدانت های زیادی وجود دارد. سه ماده فعال مهم موجود در عصاره صمغ آنغوزه عبارتند از: فرولیک اسید، کوئرستین و آمبلی فرون. با توجه به ترکیبات عصاره صمغ آنغوزه و کاربرد آن در طب سنتی، این گیاه می‌تواند کاندیدای معتبری برای ادامه تحقیقات در درمان دیابت و ناباروری ناشی از آن باشد (۱۰،۸،۵). فرولیک اسید و کوئرستین دارای اثرات ضد آپوپتوزیس و آنتی اکسیدانتی هستند (۳۱،۳۰،۲۹) و با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد از استرس اکسیداتیو و تخریب DNA جلوگیری می‌کنند (۳۳، ۳۲). کوئرستین از آپوپتوزیس و تخریب سلول‌های بیضه جلوگیری می‌کند (۳۴) آمبلی فرون هم به‌دلیل خواص آنتی اکسیدانتی و ضد استرس اکسیداتیو از تخریب بیضه جلوگیری می‌کند. آمبلی فرون با کاهش عوامل اکسیدانتی و افزایش فاکتورهای آنتی اکسیدانتی اثرات خود را بر بیضه اعمال می‌کند (۳۵). غشای سلول اسپرم به‌دلیل داشتن اسیدهای چرب غیراشباع به استرس اکسیداتیو حساس است و همان‌طور که مطالعات نشان داده است درمان با آمبلی فرون از استرس اکسیداتیو در بیضه جلوگیری می‌کند (۳۶).

در مطالعه ما نیز مانند مطالعات قبلی دیابت باعث تخریب ساختار بافتی بیضه و کاهش ضرایب اسپرم زایی شد. همچنین بررسی تاثیر عصاره صمغ آنغوزه بر شاخص های اسپرم زایی نشان داد که دوز پایین عصاره صمغ آنغوزه (۱۵۰ میلی گرم) در حیوانات دیابتی و غیر دیابتی باعث افزایش ضرایب اسپرم زایی می‌شود که این نیز می‌تواند به‌دلیل پایین‌تر بودن میزان آنتی اکسیدانت‌ها و از جمله فرولیک اسید در دوز پایین عصاره صمغ آنغوزه باشد که اثر بخشی بیشتری بر کاهش میزان گلوکز خون (۲۷) و به‌دنبال آن کاهش عوارض ناشی از بالا بودن گلوکز بر اسپرم زایی دارد.

۶- نتیجه‌گیری

داده‌ها و تجزیه و تحلیل آماری نتایج این مطالعه بر اثر مثبت عصاره صمغ آنغوزه بر اسپرم زایی و اختلالات باروری مرتبط با دیابت تاکید دارد.

۷- تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد جهت تامین منابع مالی این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

۸- منابع

1. Belhan S, Yildirim S, Huyut Z, Özdek U,et al. Effects of curcumin on sperm quality, lipid profile, antioxidant activity and histopathological changes in streptozotocininduced diabetes in rats. Andrologia. 2020 Jul;52(6): e13584. Doi: 10.1111/and.13584.

2. Naghdi M, Maghbool M, Seifalah-Zade M, Mahaldashtian M, et al. Effects of Common Fig (Ficus carica) Leaf Extracts on Sperm Parameters and Testis of Mice Intoxicated with Formaldehyde. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2016 Jan; Article ID 2539127, 9 pages
3. http://dx.doi.10.1155/2016/2539127.
4. Akang E N, Oremosu A A, Dosumu O O, Noronha C C, et al. The effect of fluted pumpkin (Telferia occidentalis) seed oil (FPSO) on testis and semen parameters. Environmental Science, Medicine, Agriculture and Biology Journal of North America. 2010; 14:697-703. http://scihub.org/ABJNA/PDF/2010/4/1-4-697-703.pdf.
5. Zahedi A, Fathiazad F, Khaki A, Ahmadnejad B. Protective Effect of Ginger on Gentamicin-Induced Apoptosis in Testis of Rats. Advanced Pharmaceutical Bulletin. 2012 Dec; 2(2):197-200.
6. Doi: 10.5681/apb.2012.030
7. Iranshahy M, Iranshahi M. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of asafoetida (Ferula assa-foetida oleo-gum-resin)-A review. Journal of Ethno Pharmacology. 2011 Mar; 134:1–10. DOI: 10.1016/j.jep.2010.11.067
8. Bagheri S M, Yadegari M, Porentezari M. Effect of Ferula assa-foetida oleo gum resin on spermatic parameters and testicular histopathology in male wistar rats. Journal of Ayurveda & Integrating Medicin. 2015 Jul-Sep; 6(3): 175-180. DOI: 10.4103/0975-9476.146552
9. Nejatbakhsh F, Shirbeigi L, Rahimi R, Abolhassani H. Review of local herbal compounds found in the Iranian traditional medicine known to optimise male fertility. Andrologia. 2016 Oct; 48:8:850-859. DOI: 10.1111/and.12675.
10. Hofer O, Widhalm M, Greger H. Circular dichroism of sesquiterpene-umbelliferone ethers and structure elucidation of a new derivative isolated from the gum resin "Asa Foetida. Monatshefte fur Chemie-Chemical Monthly. 1984 Oct; 115:1207–1218. https://doi.org/10.1007/BF00809352.
11. Khajeh M, Yamini Y, Bahramifar N, Sefidkon F, et al. Comparison of essential oils compositions of Ferula assa-foetida obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydro distillation methods. Food Chemistry. 2005 Aug; 91(4):639–644. DOI:10.1016/j.foodchem.2004.06.033
12. Karimian V, Sepehry A, Barani H, Nejad Ebrahimi S, et al. Productivity, essential oil variability and antioxidant activity of Ferula assa-foetida L. oleogum- resin during the plant exploitation period. Journal of essential oil research. 2020 July; 32(6):545-555. DOI:10.1080/10412905.2020.1794988.
13. Latifi E, Mohammadpour A A, Fathi HB, Nourani H. Antidiabetic and antihyperlipidemic effects of ethanolic Ferula assa-foetida oleo-gum-resin extract in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. Biomedicin & pharmacotherapy. 2019 Feb; 110:197-202. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.152.
14. Rafiee S, Shafi M M, Molavi M, Nazemi S. Effect of Ethyl Acetate Extract of Ferula asafoetida Oleo-Gum Resin on the Glucose Level and Lipid Profile in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. 2019 Jun; 15,2. e67042. https://doi.org/10.5812/jjnpp.67042.
15. Gupta S, Kataria M, Gupta P K, Murganandan S, et al. Protective role of extracts of neem seeds in diabetes caused by streptozotocin in rats. Journal of Ethnopharmacology. 2004 Feb; 90:185–189. DOI: 10.1016/j.jep.2003.09.024 .
16. Kodikonda M, Naik PR. Ameliorative effect of borneol, a natural by-cyclic monoterpene against hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017 Dec; 96:336–347. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.09.122 .
17. Choi Y H, Kim S G, Lee M G. Dose-independent pharmacokinetics of metformin in rats: Hepatic and gastrointestinal first-pass effects. Journal of pharmaceutical sciences. 2006; 1:95(11):2543-52. DOI: 10.1002/jps.20744.
18. Mostafa D K, Ismail C A, Ghareeb D A. Differential metformin dose-dependent effects on cognition in rats: role of Akt. Psychopharmacology. 2016; 233:2513-24. https://Doi.org/10.1007/s00213-016-4301-2.
19. Choi Y H, Lee D C, Lee I, Lee M G. Changes in metformin pharmacokinetics after intravenous and oral administration to rats with short-term and long-term diabetes induced by streptozotocin. Journal of pharmaceutical sciences. 2008 Dec; 97(12):5363-75. Doi:10.1002/jps.21349.
20. Singh A, Kukreti R, Luciano S, Kukreti S. Mechanistic Insight into Oxidative Stress-Triggered Signaling Pathways and Type 2 Diabetes. Molecules. 2022; 27(3):950. Doi:10.3390/molecules27030950.
21. Buttke T M, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. Immunology Today. 1994 Jan; 15: 7–10. DOI: 10.1016/0167-5699(94)90018-3 .
22. Kianifard D, Sadrkhanlou R A, Hasanzadeh Sh. The Histological, Histomorphometrical and Histochemical Changes of Testicular Tissue in the Metformin Treated and Untreated StreptozotocinInduced Adult Diabetic Rats. Veterinary Research Forum. 2011; 2(1):13–24. https://vrf.iranjournals.ir/article_1521.html.
23. Kianifard D, Sadrkhanlou R A, Hasanzadeh Sh. The ultrastructural changes of the sertoli and leydig cells following streptozotocin induced diabetes. Iranian Journal of Basic Medical Science. 2012 Jan-Feb; 15(1):623-35. https://ijbms.mums.ac.ir/article_4831_5e4ad5635c2f4c42fb7b6693823b6e56.pdf.

24. Ayubi A, Valizadeh R, Arshami J, Mousavi Z. The effect of wateralcholic extracted gum of Ferula asafoetida on body and testes weight, testosterone and spermatogenesis in adult male wistar rat. Iranian Journal of Animal Science Research. 2014; 6(2): 173-180.

24. Cameron D F, Murray F T, Drylie D D. Interstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testes from impotent diabetic men. The Anatomycal Record. 1985 Sep; 213:53–62. DOI: 10.1002/ar.1092130108.

25. Cai L, Chen S, Evans T, Xi Deng D, et al. Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: Prevention by endothelin antagonism. Urological Research. 2000 Oct; 28:342–347. DOI: 10.1007/s002400000134 .

26. Mokhtari M, Sharifi E, Moghaddam Nia D. Effect of alcoholic extract of foenix dactylifera spathe on histological change in testis and concentration of LH, FSH and testosterone in male rat. Iranian journal of basic medical science. 1385; 9(4(32)):265-271. https://sid.ir/paper/52389/en

27. Shafigh H, Shakeri M, Zeinoaldini S, Kohram H, et al. Improving sperm cryopreservation of rooster by using rosemary alcoholic essential oil. Journal of Animal Production. 2016; 18(3): 615-624.

28. Doi: 10.14202/vetworld.2018.590-597.

29. Sri Balasubashini M, Rukkumani R, Menon V P. Protective effects of ferulic acid on hyperlipidemic diabetic rats. Acta Diabetologica. 2003 Sep; 40:118-22. Doi: 10.1007/s00592-003-0099-6.

30. Akhlaghi F, Rajaei Z, Hadjzadeh M, Iranshahi M, et al. Antihyperglycemic effect of Asafoetida (Ferula assafoetida Oleo-Gum resin) in stereptozotosin induced diabetic rats. World Applied Sciences Journal. 2012; 17(2):157-62.

31. Khaki A, Fathiazad F, Nouri M, Khaki A, et al. Beneficial effects of quercetin on sperm parameters in streptozotocin-induced diabetic male rats. Phytotherapy Research. 2010 Sep; 24:1285–1291. DOI: 10.1002/ptr.3100

32. Kanter M, Aktas C, Erboga M. Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis. Food and Chemical Toxicology. 2012 Mar; 50:719–725. DOI: 10.1016/j.fct.2011.11.051

33. Liu C M, Zheng Y L, Lu J, Zhang Z F, et al. Quercetin protects rat liver against lead-induced oxidative stress and apoptosis. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2010 Mar; 29: 158–166. DOI: 10.1016/j.etap.2009.12.006

34. Metodiewa D, Jaiswal A K, Cenas N, Dickancaite E, et al. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinodal product. Free Radical Biology and Medicine. 1999 Jan; 26:107–116. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00167-1.

35. Roy S, Satyajit Kumar M, Noorjaman R, Sannigrahi S, et al. Ferulic acid in the treatment of post-diabetes testicular damage: relevance to the down regulation of apoptosis correlates with antioxidant status via modulation of TGF-b1, IL-1b and Akt signalling. cell biochemistry & function. 2014 Jan; 32(1): 115-124.DOI: 10.1002/cbf.2983.

36. Oluwatoyin O O, Olufunso O O. Quercetin and vitamin E attenuate diabetes-induced Testicular anomaly in Wistar rats via the mitochondrial-mediated apoptotic pathway. Andrologia. 2021 Nov; 00: e14185. DOI: 10.1111/and.14185

37. Alotaibi M F, Al-Joufi F, Abou Seif H S, Alzoghaibi M A, et al. Umbelliferone Inhibits Spermatogenic Defects and Testicular Injury in Lead-Intoxicated Rats by Suppressing Oxidative Stress and inflammation, and Improving Nrf2/HO-1 Signaling. Drug Design Development and Therapy. 2020; 14: 4003–4019. https://doi.org/10.2147/DDDT.S416910.

38. Mahmoud A M. Protective Effects of Umbelliferon in Experimental Testicular Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. Anatomy and Physiology: current researc