



بررسی تاثیر حمایتی تیموکینین بر سیتوتوکسیسیتی داروی متوتروکسات بر مورفولوژی اسپرم در موش

فاطمه شیخ بهایی^۱ (M. Sc)، مظفر خزاعی^۲ (Ph. D)، علی قنبری^۳ (Ph. D)، زهرا کشتمند^۴ (Ph. D)*

^{۱،۲} مرکز تحقیقات باروری و ناباروری، دانشکده علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
^۳ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران
^۴

چکیده

متوتروکسات، داروی ضدسرطان است که در شیمی درمانی استفاده می‌شود، اثرات جانبی این دارو شامل کاهش عملکرد غدد جنسی، آزواسپرمی و الیگواسپرمی است. تیموکینون یک ماده موثره اصلی مشتق شده از دانه سیاه دانه است. در این مطالعه تجربی ۳۰ موش سوری بالغ نر با وزن ۲۵-۳۰g به صورت تصادفی به پنج گروه شش تایی تقسیم شد. گروه کنترل نرمال سالیین را دریافت و گروه تجربی یک متوتروکسات ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم و سه گروه دیگر به ترتیب دوز ۲۰ mg/kg متوتروکسات همراه بادوزهای تیموکینون ۱۰، ۲۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی به مدت ۴ روز دریافت کردند. یک روز پس از تزریق، وزن بیضه، قطرلوله های اسپرم ساز و مورفولوژی اسپرم‌های اپیدیدیمی بررسی شد. داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزا SPSS و آزمون‌های one way-ANOVA ارزیابی شد. نتایج نشان داد که متوتروکسات به تنهایی موجب کاهش وزن بدن، کاهش وزن بیضه، قطر لوله های اسپرم ساز و کاهش اسپرم‌های نرمال نسبت به گروه کنترل شد که در $P < 0/5$ معنی دار بوده و در گروه هایی که متوتروکسات همراه با تیموکینون داده شد وزن بدن، بیضه، قطر لوله های اسپرم ساز و تعداد اسپرم با مورفولوژی نرمال نسبت به گروه تجربی ۱ افزایش یافت. نتایج تاثیر حمایتی تیموکینین بر سیتوتوکسیسیتی متوتروکسات بر بافت بیضه و مورفولوژی اسپرم را نشان می دهد که احتمالاً مربوط به ترکیبات آنتی اکسیدانی تیموکینون است.

واژه‌های کلیدی: متوتروکسات، تیموکینین، مورفولوژی اسپرم، موش

مقدمه

سنتز اسیدهای نوکلئیک می شود (۲). این دارو به یک متابولیت هیدورکسیله با فعالیت کم تبدیل شده و هم داروی اصلی و هم متابولیت آن در درون سلول‌ها برای مدت‌های طولانی باقی می‌ماند (۳،۴). متوتروکسات در درمان لنفوسارکوم، لوسمی لنفوبلاستیک حاد و تومورهای ناحیه سروگردن

متوتروکسات جزء داروهای است که در شیمی درمانی تومورهای مختلف و در درمان بیماری‌های التهابی کاربرد وسیعی دارد (۱). این دارو از طریق مهار آنزیم دی هیدروفولات ردوکتاز، موجب مهار

تقریباً ۶۱/۴۸ درصد از وزن روغن فرار آنرا تشکیل می‌دهد. دانه گیاه ضمنا حاوی چربی، ویتامین ها، مواد معدنی و پروتئین (شامل هشت اسید آمینه ضروری) و کربوهیدرات ها شامل مونوساکاریدها به شکل گلوکز، زیلوز، آرابینوز و رامنوز است. دانه گیاه منبع غنی اسیدهای چرب ضروری و غیراشباع است. اصلی ترین اسید چرب غیر اشباع، اسید لینولئیک و سپس اسید اولئیک است. ترکیبات دیگری مانند فسفو لیپیدها، کاروتن، کلسیم، آهن و پتاسیم نیز در دانه‌ها وجود دارد. (۱۳). تیموکینون مهم ترین ماده موثره موجود در دانه های گیاه سیاه دانه بوده و دارای اثرات فارمالوژیکی متعدد بوده و از آن جمله می توان به اثرات آرام بخشی، ضد ایسکمی، ضد تشنجی، ضد دردی، ضد التهابی، ضد سرطانی، محافظت کبدی اشاره کرد(۱۴). در مورد خاصیت ضدتوموری، تحقیقات نشان داده اند که از یک طرف، تیموکینون موجب القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود (۱۵).

از آنجا که گزارشی مبنی بر تاثیر تیموکینون بر ناهنجاری های ایجاد شده در مورفولوژی اسپرم ناشی از مصرف متوتروکسات یافت نشده و با توجه به اینکه یکی از شایع ترین علل ناباروی مردانی که از داروهای شیمی درمانی ایجاد می‌شود ناهنجاری های مورفولوژیکی اسپرم است، لذا، هدف از این تحقیق بررسی تاثیر حمایتی تیموکینین بر اثرات سیتوتوکسیسیتی ناشی از متوتروکسات بر مورفولوژی اسپرم در موش سوری است.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد آزمایش در این تحقیق ۳۰ سر

کاربرد دارد(۵،۶). این دارو همچنین به عنوان درمان کمکی در استئوسارکوما، تومورهای مثانه، مغز، سینه و دستگاه ادراری - تناسلی استفاده می شود(۷، ۸). متوتروکسات امروزه به عنوان یکی از داروهای انتخابی در درمان آرتريت روماتويد در نظر گرفته می (۹). همچنین در درمان پسوریازیس، آرتريت پسوریاتیک، پلی میوزیت، درماتومیوزیت به کار رفته است(۱۰).

گیاه سیاه دانه (*Nigella sativa*) که تاریخچه غنی طبی دارد. این گیاه بومی اروپای جنوبی، افریقای شمالی و آسیا است. گیاه سیاه دانه توسط مصری‌های باستان و پزشکان یونانی برای درمان سردرد، احتقان بینی، آسم، آلرژی، تقویت سیستم ایمنی، درد دندان و کرم‌های روده ای و به عنوان دیورتیک، برای القاء قاعدگی و افزایش تولید شیر مورد استفاده قرار می گرفته است. همچنین به طور وسیع در درمان آسم، سردرد، اسهال خونی، عفونت ها، چاقی، کمر درد، فشار خون و مشکلات گوارشی در خاور میانه و خاور دور استفاده می شود و به صورت موضعی در درمان آبه ها، زخم‌های بینی و روماتیسم کاربرد دارد (۱۱). گیاه سیاه دانه با نام علمی *Nigella sativa* از خانواده (*Ranunculaceae*) گیاهی است با گل‌های سفید یا آبی کم رنگ تا پرنگ دارای دانه‌های سفید شیری رنگ که در تماس با هوا سیاه رنگ می شوند(۱۲). چهار نوع آکالوئید با نام های نیجلامین B₁، B₂، A₁، A₂ از گیاه سیاه دانه استخراج شده است. تیموکینون، دی تیموکینون، تیموهیدروکینون و تیمول مواد موثره اصلی در عصاره آبی دانه گیاه هستند. ۳۰ درصد وزن سیاه دانه را روغن تشکیل می‌دهد که P-cymen اصلی ترین ترکیب آن است و

محتوای FBS ۵٪ خرد و پس از به هم زدن آن، نمونه به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ۳۷ C انکوبه شد. به منظور بررسی مورفولوژی اسپرم‌ها اسمیر تهیه کرده، بدین منظور یک قطره از نمونه را بر روی لام قرار داده بعد از خشک شدن لام در یک محیط استریل اسپرها را با استفاده از الکل ۷۰ درصد فیکس، سپس لام های تهیه شده با استفاده از رنگ آمیزی پاپانیکولا جهت بررسی مورفولوژی اسپرم‌ها رنگ آمیزی شد (۲۵). از هر لام ۱۰۰ اسپرم را از لحاظ مورفولوژی نرمال، غیر نرمال (اسپرم بدون دم، بدون سر، بدون قلاب) با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار داده شد.

از سویی برای مطالعه قطر لوله های اسپرم ساز، با باز کردن ناحیه صفاقی از طریق شکاف عرضی شکمی، بیضه ها خارج، سپس در فرمالین ۹۰ درصد قرار داده شد. پس از ثبوت بافتی و قالب گیری، از آنان مقاطع بافتی با ضخامت ۵ میکرون تهیه و با هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شدند. مقاطع بافتی تهیه شده با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. برای اندازه گیری قطر، از نرم افزار موتیک استفاده گردید. همچنین از هر حیوان حداقل ۲۰ لوله اسپرم ساز مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت.

آمار

جهت بررسی و مقایسه نتایج حاصل از مورفولوژی اسپرم‌ها بین گروه‌های کنترل و تجربی با استفاده از نرم افزار SPSS، آزمون One-way ANOVA و به دنبال آن آزمون تکمیلی Tukey استفاده گردید. مرز استنتاج آماری نتایج $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

موش بالغ نژاد Balb/C با وزن متوسط ۲۵-۳۰ گرم بود. موش ۱ به ۵ گروه ۶ تایی تقسیم و در تمام مدت ۴ روز آزمایش، حیوانات طی دوره ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفتند. آب آشامیدنی حیوانات در تمام طول آزمایش آب لوله کشی شهری و تغذیه به صورت غذای مخصوص موش بود. درجه حرارت در طول آزمایش ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تابش نور به صورت غیرمستقیم و از طریق پنجره‌های آزمایشگاه صورت می‌گرفت. تعداد ۳۰ موش از نژاد Balb/c با وزن 25 ± 30 در ۶ گروه ۵ تایی تقسیم بندی شد. گروه کنترل موش‌هایی که نرمال سالیین را دریافت کردند. گروه تجربی ۱ موش‌هایی که دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم متوتروکسات به صورت تک دوز به آن‌ها تزریق گردید. گروه تجربی ۲، موش‌هایی که متوتروکسات تک دوز را به صورت داخل صفاقی همراه با تیموکینون ۲ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کردند. گروه تجربی ۳، موش‌هایی که متوتروکسات تک دوز را به صورت داخل صفاقی همراه با تیموکینون ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کردند. موش‌هایی که متوتروکسات تک دوز را به صورت داخل صفاقی همراه با تیموکینون ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کردند. مدت زمان دریافت تیموکینون در گروه‌های تجربی ۲، ۳ و ۴، ۴ روز و دریافت داروبه صورت تزریق داخل صفاقی می‌باشد. یک روز پس از آخرین تزریق، موش‌ها درون دسیکاتور حاوی پنبه آغشته به اتر قرار گرفته و بیهوش شدند. جهت بررسی مورفولوژی اسپرم، اپیدیدیم چپ حیوانات به دقت از بدن خارج شد. بافت اپیدیدیم در یک پتری دیش حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت DMEM

نتایج

به گروه کنترل کاهش یافته و این کاهش در گروه‌های ۲، ۳ و ۴ در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار بود و در گروه‌های تجربی ۲، ۳ و ۴ تعداد سلول‌های اسپرم با مورفولوژی نرمال نسبت به گروه تجربی ۱ افزایش یافته که البته در گروه تجربی ۳ این افزایش در سطح $P < 0.01$ معنی‌دار است. فتومیکروگراف ۱ انواع شکل‌های نرمال و غیر طبیعی اسپرم (بدون سر، بدون دم، بدون قلاب) را در این مطالعه نشان می‌دهد. همچنین جدول ۱ نشان می‌دهد قطر لوله‌های اسپرم ساز در گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳ و ۴ نسبت به گروه کنترل افزایش یافته که این افزایش در گروه تجربی ۱ معنی‌دار بوده است ($P < 0.05$). قطر لوله‌های اسپرم ساز در گروه‌های تجربی ۲، ۳ و ۴ که تیموکینون را در دوزهای متفاوت همراه با داروی متوتروکسات تک دوز دریافت کردند نسبت به گروه تجربی ۱ افزایش یافته که سطح معنی‌داری نشان داده شده است (فتومیکروگراف ۲، الف تا ه) ($P < 0.05$).

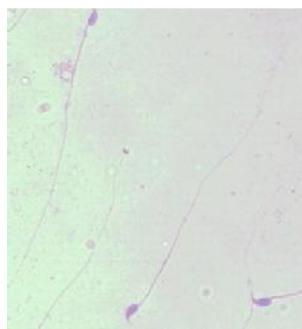
با توجه به جدول ۱ مشاهده می‌شود، در گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳ و ۴ وزن بدن، نسبت به گروه کنترل کاهش یافته که این کاهش در گروه‌های تجربی ۱ معنی‌دار است ($P < 0.05$), در گروه‌های تجربی ۲، ۳ و ۴ با افزایش میزان دوز عصاره تیموکینون، وزن بدن نسبت به گروه تجربی ۱ افزایش یافته است. همچنین با توجه به جدول مشاهده می‌شود در گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳ و ۴ وزن بیضه نسبت به گروه کنترل کاهش یافته که در گروه‌های تجربی ۱ این کاهش معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$). در گروه‌های تجربی ۲، ۳ و ۴ با افزایش میزان دوز تیموکینون وزن بیضه نسبت به گروه تجربی ۱ افزایش یافته، البته در گروه تجربی ۲، ۳ و ۴ افزایش معنی‌داری نسبت به گروه تجربی ۱ نشان داده نشد. از طرف دیگر در گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳ و ۴ تعداد سلول‌های اسپرم با مورفولوژی نرمال نسبت

جدول ۱: مقایسه گروه‌های کنترل و ۴ گروه تجربی از نظر پارامترهای وزن بدن، بیضه و تعداد سلول‌های اسپرم با مورفولوژی نرمال.

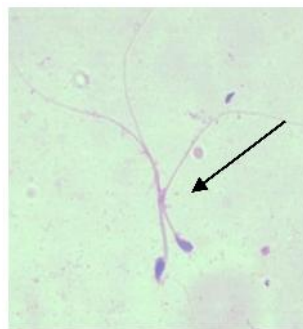
پارامترها	گروه کنترل	گروه تجربی ۱	گروه تجربی ۲	گروه تجربی ۳	گروه تجربی ۴
وزن بدن (گرم)	۲۸/۳۳۳۳±۸۴/۳۲۷	۲۶/۱۶۶۷±۱/۱۳۷۷۴ *	۲۶/۵±۳۶/۵۱۵	۲۷/۵±۳۶/۵۱۵	۲۷/۵±۰/۶۱۹۱۶
وزن بیضه (گرم)	۰/۳۳±۰/۰۰۱۵۳	۰/۲۳۵±۰/۰۰۱۸۳ ***	۰/۲۷۰±۰/۰۰۱	۰/۳±۰/۰۰۲۱۱ α	۰/۲۸±۰/۰۰۱۳۳
اسپرم با مورفولوژی نرمال (درصد)	۶۱/۳۳۳۳±۴/۱۷۶۶۵	۳۲±۷۰/۴۹۳ **	۳۲/۵±۷۲۷۲۳	۵۷/۱۶۶۷±۷۶۳۱۳ β	۴۰/۱۶۶۷±۳۶۹۷۲
قطر لوله‌های اسپرم ساز	۱۰۳±۷/۱۳۱۱۳	۱۲۸/۹۸۵۰±۱/۱۳۴۰۷ **	۱۱۲ /۶۷±۸/۳۰۰۲۸	۱۰۵±۳/۴۸۳۷۹	۱۰۸/۴۳±۷/۴۱۰۳۳

علامت ** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار $P < 0.01$ با گروه کنترل است.
علامت α نشان دهنده اختلاف معنی‌دار $P < 0.05$ با گروه تجربی ۱ است.
علامت β نشان دهنده اختلاف معنی‌دار $P < 0.01$ با گروه تجربی ۱ است.

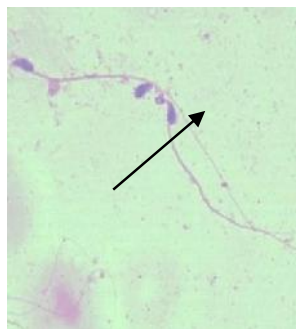
مقادیر بر اساس میانگین \pm خطای معیار میانگین آورده شده است.
سطح اختلاف معنی‌دار $P < 0.05$ است.
علامت * نشان دهنده اختلاف معنی‌دار $P < 0.05$ با گروه کنترل است.



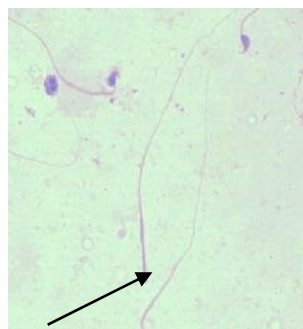
(ب)



(الف)

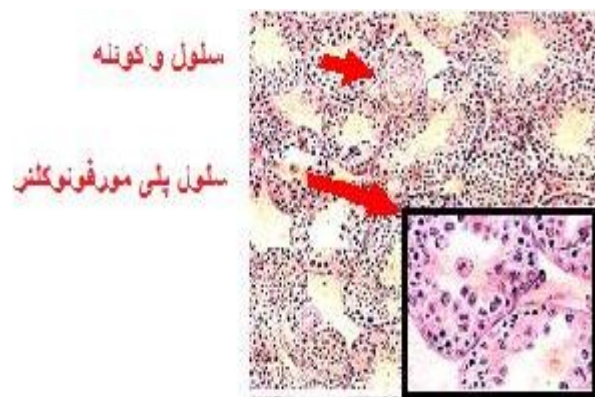


(د)

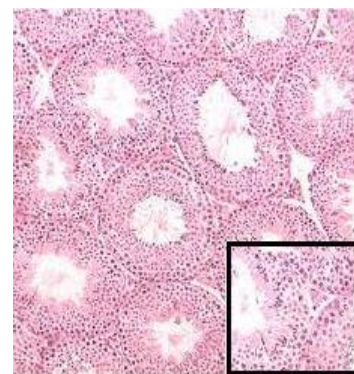


(ج)

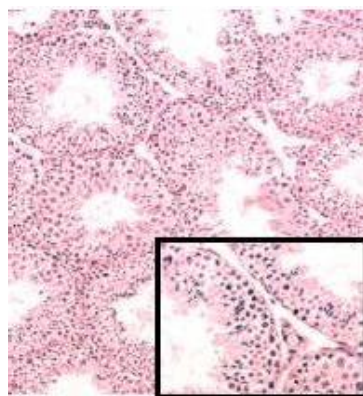
فتمیکروگراف ۱: انواع شکل های نرمال و غیرطبیعی اسپرم با بزرگنمایی ۴۰۰×. الف: اسپرم نرمال، ب: اسپرم بدون قلاب، ج: اسپرم بدون دم، د: اسپرم بدون سر.



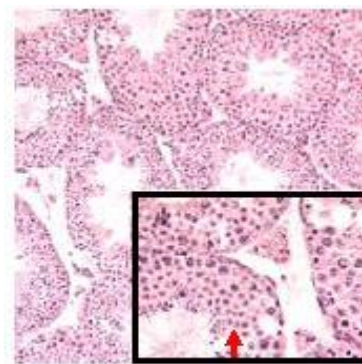
(ب)



(الف)

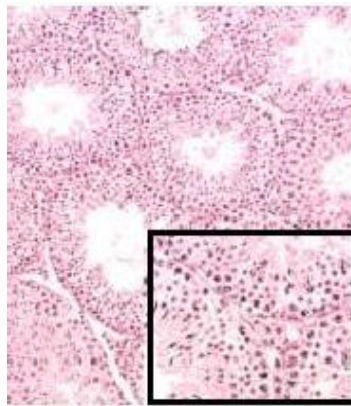


(د)



سلول واکونه

(ج)



(و)

فتومیکروگراف ۲: لوله های اسپرم ساز در مراحل مختلفی از فعالیت اسپرماتوژنز هستند. (بزرگنمایی $100\times$). همچنین بزرگنمایی ۴۰۰ این مقاطع در گوشه پائین و راست هر تصویر آورده شده است. الف: گروه کنترل، ب: گروه شم، ج: گروه دریافت کننده دارو تروموکسات (۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، د: گروه دریافت کننده تروموکسات (۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم) + تیموکینون (۲ میلی گرم بر کیلوگرم)، ه: گروه دریافت کننده متوتروکسات (۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم) + تیموکینون (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، و: گروه دریافت کننده متوتروکسات (۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم) + تیموکینون (۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم).

بحث

فر طی اسپرماتوژنومی شود (۱۸). استفاده از مدل های حیوانی برای ارزیابی میزان توکسیسیته ایجاد شده توسط داروهای ضد سرطان در سلول های زایا می تواند جایگزین خوبی برای انسان باشد (۱۸، ۱۹). در مطالعه حاضر، کاهش در وزن بدن در گروه دریافت کننده متوتروکسات در مقایسه با گروه کنترل در انتهای روز چهارم کاملاً آشکار بود، که در واقع نشان دهنده آسیب عمومی می باشد. نتایج، کاهش در وزن بیضه و تعداد اسپرم را به طور قابل توجهی نشان دادند. کاهش در تعداد اسپرم اغلب در نتیجه تداخل در فرآیند اسپرماتوژنز و حذف اسپرم ها در مراحل مختلف تکامل می باشد (۲۰). مطالعات قبلی نیز نشان دادند که متوتروکسات به شکل چشمگیری در حالت وابسته به دوز منجر به کاهش تعداد اسپرم می شود. کاهش در تعداد اسپرم، اغلب منجر به تداخل در فرآیند اسپرماتوژنز و حذف سلول های اسپرم در مراحل مختلف تکامل می شود (۲۱). آسیب جنسی

در این مطالعه، اثرات حفاظتی تیموکینون بر علیه توکسیسیته ایجاد شده توسط متوتروکسات در سلول های زایای بیضه موش مورد مطالعه قرار گرفت. توکسیسیته سلول های زایا از طریق ارزیابی وزن بیضه ها، تعداد اسپرم و بررسی های بافت شناسی بیضه ارزیابی شد. بررسی ها نشان داد که بسیاری از داروهای مورد استفاده در شیمی درمانی، منجر به اثرات جانبی سیتوتوکسیک در اندام های دیگر می شود (۱۶). اپیتلیوم ژرمینال بیضه ای، به علت فعالیت میتوزی بالا، مشخصاً در اثر استفاده از این داروها، مستعد آسیب می باشد (۱۷). باروری در مردان وابسته به بازسازی دائمی سلول های زایا و تشکیل سلول های اسپرم را از این سلول ها است (۱۶). گزارش شده است که استفاده از داروهای ضد سرطان مانند متوتروکسات وابسته به دوز، منجر به القاء سیتوتوکسیسیته در تکثیر محتوای لوله های سمینی

گرفته است. اثرات آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی تیموکوئینین در بیماری‌های مختلف شامل آنسفالومیلیت، دیابت و آسم گزارش شده است. اثرات ضد سرطانی تیموکینون بواسطه عملکردهای ضد تکثیر، القاء آپوپتوز، توقف چرخه سلولی، تولید ROS و اثرات ضد آنژیوژنری می باشد (۲۶).

توانایی داروهای شیمی درمانی برای القاء آپوپتوز یک فاکتور مهم در تعیین اثر گذاری آن‌ها در درمان سرطان می باشد (۲۷). تیموکینون وابسته به دوز، منجر به القاء آپوپتوز در انواع مختلف سلول‌های سرطانی می شود. سمیت دارو یک مشکل رایج در شیمی درمانی می باشد که بروز پاسخ مناسب را مختل می‌کند (۲۸). استفاده از محصولات طبیعی به عنوان مکمل داروهای پزشکی متداول از مدت ها پیش پیشنهاد شده است. مطالعات گسترده‌ای به منظور شناسایی کاندیدا های بالقوه‌ای که سمیت داروها را بدون تداخل با اثرات درمانی سرکوب متاستاز و آنژیوژن آن‌ها کاهش می دهند، صورت گرفته است (۲۹).

به طور خلاصه، گزارشات متعدد مبنی بر اثرات حفاظتی تیموکوئینین بر سمیت دارویی، امکان نقش مکملی تیموکوئینین را در بهبود زندگی بیماران سرطانی را پیشنهاد می‌کند. بنابراین، ترکیب تیموکینون با داروهای شیمی درمانی می‌تواند یک روش درمانی جدید را ارائه دهد. اگرچه تحقیقات بیشتری به منظور تائید قطعی اساس مولکولی عمل تیموکوئینین ضروری است. به علاوه، شکل جدیدی از آنالوگ تیموکینون سنتز شده است که دارای اثرات ضد سرطانی و آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به تیموکینون می باشد. علی رغم اینکه اثرات درمانی

ناشی از متوروکسات از طریق ارزیابی بافت شناسی بیضه‌ها قابل بررسی می‌باشد. افزایش واکوئولیزاسیون، کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتید در لوله‌های سمینی فر نشان دهنده این است که متوروکسات در فرایند اسپرماتوژنز تداخل ایجاد می‌کند. مطالعات نشان داده است که به کار گیری مزمن دوز پایین متوروکسات منجر به کاهش در اندازه لوله‌های سمینی فروز، سلول‌های لایدیگ، سلول‌های سرتولی و عدم تراکم توده کروماتینی در اسپرماتوسیت‌های رت می‌شود (۲۲). مطالعات مشابه دیگر نیز مشخص نمود که تیمار مکرر با MTX باعث آسیب در اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت‌ها در رت می‌شود (۱۱، ۲۳). مطالعه حاضر نشان داد تزریق همزمان ۲۰ mg/kg متوروکسات همراه با دوزهای ۲ و ۲۰، ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم تیموکینون شدت تغییرات مخرب و مورفولوژیک در سلول‌های زایا و مورفولوژی اسپرم را نسبت گروه دریافت کننده متوروکسات کمتر بود.

این نتایج، گزارشات قبلی را که نشان دادند ترکیب تیموکینون و داروهای متداول در شیمی درمانی می‌توانند اثرات درمانی مطلوب تری را ایجاد نموده و سمیت این داروها را کاهش دهد، تائید می‌نماید (۲۴). مطالعات دیگر نشان داد تیموکینون منجر به بهبودی مورفولوژیکی آسیب‌های تخریب کننده نوروها در هیپوکامپ به دنبال در معرض قرار گرفتن مزمن با تولوئن در رت‌ها می‌گردد (۲۵). تیموکینون مهمترین ماده موثره موجود در دانه‌های گیاه سیاه دانه است که به دلیل اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و همچنین فعالیت ضد سرطانی در هر دوی مدل‌های *in vivo* و *in vitro* مورد مطالعه قرار

- 6- Saxen, A.K., Dhungel, S., Bhattacharya, S., Jha, C.B., Srivastava, A.K. (2004). Effect of chronic low dose of methotrexate on cellular proliferation during spermatogenesis in rats. *Arch Androl.* 50: 33-35.
- 7- Riccardi, R., Vigersky, R.A., Barnes, S., Bleyer, W.A., Poplack, D.G. (1982). Methotrexate levels in the interstitial space and seminiferous tubule of rat testis. *Cancer Res.* 42: 1617-1619.
- 8- Doyle, L.A., Berg, C., Bottino, G., Chabner, B. (1983). Erythema and desquamation after high-dose methotrexate. *Ann Intern Med.* 98: 611-612.
- 9- Salehi surmaghi, M.H. Nigella Sativa. (2008). In *Herbal Medicine and Herbal Therapy*, volum 2, Donyay Taghziah press. Tehran Iran. 216-219.
- 10- Morikawa, T., Xu, F., Kashima, Y., Matsuda, H., Ninomiya, K., Yoshikawa, M. (2004). Novel dolabellanetype diterpene alkaloid with lipid metabolism promoting activities from the seeds of *Nigella sativa*. *Org. Lett.* 6: 869 – 872.
- 11- Geng, D., Zhang, S., Lan, J. (2009). Analysis on chemical components of volatile oil and determination of thymoquinone from seed of *Nigella glandulifera*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 34 (22): 2887-90
- 12- Nickavar, B., Mojab, F., Javidnia, K., Amoli, M.A. (2003). Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Z. Naturforsch.* 58: 629 – 631.
- 13- Gali-Muhtasib, H., Roessner, A., Schneider-Stock, R. (2006). Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(8):1249-53.
- 14- Bannister, L. H., Berry, M. M., Clins, P., Dussek, J. E., Feguson MWJ. Gray (2004). *Anatomy*, 39th Ed. Churchill Livingstone.. 1848-1861
- 15- Prahalathan, C., Selvakumar, E., Varalakshmi, P. (2005). Protective effect of lipoic acid on adriamycin-induced testicular toxicity. *Clin Chim.* 360:160–166.
- 16- Kim, J.C., Kim, K.H., Chung, M.K. (1999). Testicular cytotoxicity of DA-125,

تیموکوئینین در رده های سلولی و مدل های حیوانی مختلف نشان داده شده است، تا به امروز مطالعات بالینی کمی با استفاده از تیموکوئینین صورت گرفته است که لزوم مطالعات بیشتری در این رابطه را نشان می دهد. به علاوه، پیرامون دسترسی بیولوژیکی و سایر پارامترهای دارویی تیموکوئینین هنوز داده ها کامل نیستند. از این رو قبل از اینکه تیموکوئینین به عنوان دارویی برای درمان انواع مختلف سرطان ها و اختلالات التهابی به شکل گسترده مورد استفاده قرار گیرد، باید مطالعات بیشتری صورت گیرد.

تشکر

از دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات باروری و ناباروری و گروه آناتومی کرمانشاه که در انجام این پروژه ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می نمایم.

References:

- 1- Tomoda, R., Seto, M., Hioki, Y., Sonoda, J., Matsumine, A., Kusuzaki, K., et al. (2005). Low- dose methotrexate inhibits lung metastasis and lengthens survival in rat osteosarcoma. *Clin Exp Metastasis.* 22:559-564.
- 2- Padmanabhan, S., Tripathi, D.N., Vikram, A., Ramarao, P., Jena, G.B. (2008). Cytotoxic and genotoxic effects of methotrexate in germ cells of male Swiss mice. *Mutat Res.* 655(1-2):59-67
- 3- Morikawa, T., Xu, F., Kashima, Y., Matsuda, H., Ninomiya, K., Yoshikawa, M. (2004). Novel dolabellanetype diterpene alkaloid with lipid metabolism promoting activities from the seeds of *Nigella sativa*. *Org. Lett.* 6: 869 – 872.
- 4- Krakower, G.R., Kamen, B.A. (1983). In situ methotrexate polyglutamate formation in rat tissues. *J Pharmacol Exp Ther.* 227: 633-638.
- 5- Johnson, F.E., Farr, S.A., Mawad, M., Woo, Y.C. (1994). Testicular cytotoxicity of intravenous methotrexate in rats. *J SurgOncol.* 55: 175-178.

- a new anthracycline anticancer agent, in rats. *Reprod Toxicol.* 13: 391–397.
- 17- Sxener, G., Demiralp, E.E, Cetiner, M., Ercan, F., Yegen, B.C. (2006). B-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Eur J Pharmacol.* 542: 170–178.
- 18- Chiang, H.M., Fang, S.H., Wen, K.C, Hsiu., S.L., Tsai, S.Y., Hou, Y.C., et al. (2005). Life-threatening interaction between the root extract of *Pueraria lobata* and methotrexate in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 209: 263–268.
- 19- Novakovic, T., Dordevic, O.M., Grujicic, D., Marinkovic, D., Jankovic, S., Arsenijevic, S. (2003). Effect of intratumoral application of methotrexate in vivo on frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes, *Arch. Oncol.* 11: 1–4.
- 20- Aggarwal, P., Naik, S., Mishra, K.P., Aggarwal, A., Misra, R. (2006). Correlation between methotrexate efficacy & toxicity with C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate gene in rheumatoid arthritis patients on folate supplementation. *Indian J. Med. Res.* 124: 521–526.
- 21- Kobayashi, K., Terada, C., Tsukamoto, I. (2002). Methotrexate-induced apoptosis in hepatocytes after partial hepatectomy, *Eur. J. Pharmacol.* 438: 19–24
- 22- Elangovan, N., Chiou T.J., Tzeng W.F., Chu S.T. (2006). Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. *Toxicology* 222: 60–70
- 23- Tripathi D.N, Jena G.B. (2008). Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells. *Toxicology* 248:96–103.
- 24- Selvakumar, K.J., Hanneman, W.H., Schimenti, J.C. (1997). Evidence for cyclophosphamide-induced gene conversion and mutation in mouse germ cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 147: 343–350.
- 25- Russell, L.D, Russell, J.A. (1991). Short-term morphological response of the rat testis to administration of five chemotherapeutic agents. *Am. J. Anat.* 192: 142–168.
- 26- Hengartner, M.O., Horovitz, H. R. (1994). *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian protooncogene *bcl-2*. *Cell* 76: 665–676.
- 27- Woo, C.C., Kumar., A.P., Sethi, G., Tan, K.H.B. (2012). Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochemical Pharmacology* 83: 443–445.
- 28- Kanter, M. (2008). *Nigella sativa* and derived thymoquinone prevents hippocampal neurodegeneration after chronic toluene exposure in rats. *Neurochem Res* 33 (3):579–588.
- 29- Li, Q.X., Yu, D.H, Liu, G., Ke, N.,McKelvy. J.,Wong-Staal, F. (2008). Selective anticancer strategies via intervention of the death pathways relevant to cell transformation. *Cell DeathDiffer.* 15: 197–210.

