زیست‌شناسی جانوری، سال پانزدهم، شماره دوم، زمستان ۱۴۰۱، صفحات ۱۴۶- ۱۳۵

مقاله پژوهشی

بررسی اثر حفاظتی تیموکینون بر روند اسپرماتوژنزیس و شاخص‌های عملکردی اسپرم در موش سفید صحرایی دریافت‌کننده تری‌سیکلازول

رامونا کسری کرمانشاهی[۱]، اسماعیل فتاحی[۱*]، سیدغلامعلی جورسرایی[۲]، سهراب کاظمی[۳]، مریم غلامی‌تبارطبری[۴]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد آیت‌الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

۲- گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۳- مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۴- مرکز تحقیقات باروری سالم، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

*مسئول مکاتبات: Esmail_fattahy@yahoo.com

DOI: 10.22034/ascij.2022.1962239.1400

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۲

چکیده

ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی مانند تیموکینون، به میزان قابل‌توجهی مانع از ایجاد تغییرات حاصل از اثر مواد شیمیایی سمی نظیر تری‌سیکلازول روی ارگان‌های احشایی می‌شوند. لذا این مطالعه به‌منظور امکان به‌کارگیری تیموکینون جهت ممانعت از اثرات مخرب سم‌تری سیکلازول بر روند اسپرماتوژنزیس رت‌های نر انجام شد. در این مطالعه تجربی، تعداد ۴۲ سر موش صحرایی نر به‌طور تصادفی به ۷ گروه شامل: گروه کنترل (بدون دریافت دارو)، گروه شم (محلول ۱۰ درصد توئین ۸۰)، گروه ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تری‌سیکلازول، گروه آزمایشی ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تیموکینون، گروه آزمایشی ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تیموکینون، گروه آزمایشی تری‌سیکلازول ۲۰ و تیموکینون ۱۰ و گروه تری‌سیکلازول ۲۰ و تیموکینون ۲۰ تقسیم شدند. در پایان دوره‌ی تیمار، با تهیه برش‌های بافتی از بیضه، سلول‌های مسیر اسپرماتوژنز در واحد سطح مورد ارزیابی قرار گرفتند. طبق یافته‌ها، میانگین تعداد و تحرک اسپرم و تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه‌های تیموکینون ۲۰ و گروه تیموکینون ۱۰ در مقایسه با گروه تری‌سیکلازول افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < ۰/۰۵$)؛ اما تعداد سلول‌های لیدیگ در گروه‌های تیموکینون ۲۰ و گروه تیموکینون ۱۰ در مقایسه با گروه تری‌سیکلازول کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p < ۰/۰۵$). نتایج مطالعه نشان داد که تیموکینون به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی می‌تواند سمیت ناشی از تری‌سیکلازول بر فرآیند اسپرماتوزنز را تا حدودی جبران نماید.

کلمات کلیدی: تیموکینون، اسپرماتوژنزیس، سم تری‌سیکلازول، آنتی‌اکسیدانت.

مقدمه

ناباروری و درمان آن بدون در نظر گرفتن نتیجه حاملگی یا عدم حاملگی، پیامدهایی ازجمله عواقب مالی، روانی، بهداشتی و اجتماعی دارد. برآوردهای جهانی از ناباروری حاکی از این هستند که تقریباً ۷۲ میلیون زوج در جهان نابارور هستند. میزان ناباروری در کشورهای مختلف از پنج درصد در برخی از

کشورهای توسعه‌یافته تا بیش از ۳۰ درصد در صحرای آفریقا متفاوت است. البته به دلیل تعاریف مختلف از ناباروری، آمارهایی نیز که در مورد برآورد ناباروری ارائه و منتشر می‌شود، متفاوت است. کشور ما نیز از این امر مستثنا نیست و دامنه آن در مطالعات مختلف از ۷/۸ درصد تا ۲۰ درصد گزارش شده است (٤). عوامل متعددی می‌تواند تولید اسپرم را تحت تأثیر قرار داده و در بروز ناباروری دخیل باشند. از میان این عوامل می‌توان به مصرف داروهای شیمی‌درمانی، آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد سمی، آفت‌کش‌ها، تشعشعات، استرس، آلودگی هوا و عدم دریافت کافی ویتامین‌ها اشاره نمود. این عوامل می‌توانند با ایجاد رادیکال‌های آزاد و اکسیداسیون سلول‌های ژرمینال جنسی در بافت بیضه غلظت اسپرم را کاهش دهند. تحقیقات نشان می‌دهند که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها و ویتامین‌های A و E و C از طریق کاهش آسیب‌های ایجادشده توسط رادیکال‌های آزاد و تقویت و استحکام سدخونی اسپرم‌ها، می‌تواند در درمان ناباروری مردان مؤثر واقع گردد (١٤).

در بین روش‌های مختلف درمان، استفاده از گیاهان دارویی یکی از روش‌هایی است که در بین ملت‌های مختلف برای مواجهه با این مشکل انتخاب شده است. این گیاهان در درمان اختلالات تولید اسپرم، سردمزاجی، ضعف و سستی جنسی در طرفین و مشکل نعوظ به‌کاربرده شده است. استفاده از گیاهان دارویی یک گزینه‌ی مقرون‌به‌صرفه و در دسترس را در اختیار همه زوج‌های نابارور قرار می‌دهد (۱۸).

سیاه‌دانه با نام علمی *Nigella sativa* یک گیاه علفی یک‌ساله، دو لپه متعلق به زیررده جداگلبرگان و تیره آلاله است. دانه‌ها به‌عنوان بخش اصلی مورداستفاده، دارای ترکیبات مختلفی هستند که ازجمله می‌توان به وجود قندهای احیاکننده، موسیلاژها، فیبرخام، رزین، آلکالوئیدهایی نظیر نیجل آمین، استرول‌ها، تانین‌ها، فلاونوییدها، مواد معدنی و ویتامین‌ها شاره کرد (۱۰). سیاه‌دانه به‌صورت سنتی برای اهداف پزشکی استفاده می‌شود که هم گیاه و هم عصاره روغنی آن برای حفظ سلامت سیستم تنفس و سلامت معده، روده، کلیه و عملکرد کبد کاربرد دارد (۲۵). سیاه‌دانه باعث افزایش اسپرماتوژنز در مراحل اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه، تعداد سلول‌های اسپرماتوزوآ، ترشحات غدد ضمیمه و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در سیستم تولیدمثلی می‌شود که همگی نشانگر اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی این ماده است. تحقیقات نشان داده است که بیشتر فعالیت بیولوژیکی دانه این گیاه مربوط به تیموکینون، یعنی جز اصلی روغن فرار دانه گیاه سیاه‌دانه است. هم روغن و هم اجزای تشکیل‌دهنده سیاه‌دانه و به‌ویژه تیموکینون دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی است. خواص ضدالتهابی آن از طریق سرکوب واسطه‌های التهابی مانند پروستاگلاندین‌ها و لکوترین‌ها اعمال می‌شود (۲۰، ۲۲).

مواد شیمیایی فراوانی در محیط وجود دارد که شبه هورمون بوده و حاصل فعالیت‌های بشر در طبیعت هستند. این مواد که توانایی تداخل با سیستم اندوکرینی جانداران را دارند، روی سیستم تولیدمثلی تاثیرگذاشته (١٦) و به‌عنوان گزنواستروژن عمل می‌کنند، به این معنی که می‌توانند عملکرد اندروژن‌های استروژنی را تقلید کنند، با آن مقابله کنند یا آن را تغییر دهند و درنهایت باعث اختلال در عملکرد سیستم تولیدمثلی حیوانات شوند (۱۵).

تری سیکلازول یکی از سموم قارچ‌کشی است که در کشاورزی برای از بین بردن بیماری بلاست برنج به کار می‌رود. این سم از گروه سموم تریازول می‌باشد. این سم با مهار فعالیت آنزیم لانوسترول ١٤ آلفا -دمتیلاز سبب اختلال در بیوسنتز ارگوسترول می‌شود. ارگوسترول یک جزء ضروری برای غشای قارچ است

و مهار آن منجر به مرگ سلول می‌شود. در پستانداران نیز این آنزیم عملکرد مشابه در قارچ‌ها را دارد. لذا استفاده از سم با اختلال در بیوسنتز کلسترول، منجر به کاهش در سنتز هورمون‌های استروئیدی می‌شود؛ بنابراین کاهش فعالیت غدد درون‌ریز به اختلال در تولیدمثل و باروری منتهی می‌شود. متابولیت‌های حاصل از قارچ‌کش‌هایی مانند تری‌سیکلازول می‌توانند، سبب تکثیر سلولی، القای آنزیم‌های کبدی، هپاتوتوکسیتی، هپاتو کارسینوژنز و نوروتوکسیتی در موش‌ها شوند (۵). مطالعات نشان داده‌اند که‌تری سیکلازول با تحریک و مهار بیان ژن، باعث نقایص اسکلتی همچون بدشکلی سروصورت، هیدروسفالی و تغییرات در رشد سلول و تمایز می‌شود (۱۷).

اسپرماتوژنز فرآیند پیچیده‌ای است که در آن سلول‌های زایای تناسلی نر (اسپرماتوگونی) ابتدا به طریق میتوزی تکثیر پیدا کرده، سپس متحمل میوز می‌شوند و متعاقباً به سلول‌های بسیار متحرک اسپرماتوزوئید تمایز پیدا می‌کنند. در طی این فرایند بسیاری از ژن‌های خاص در بیضه وجود دارد که ممکن است نقش مهمی در اسپرماتوژنز داشته باشند که ژن‌های شونیست (۱۲) نامیده می‌شود. نتایج پژوهش فتاحی و همکاران (۸) نشان داد که سم تری‌سیکلاوزل می‌تواند با اختلال در بافت بیضه و ترشح هورمون تستوسترون، بر روند تولید اسپرم تأثیر منفی بر جای بگذارد. در تحقیق دیگری نشان داده شد که تغییرات آنزیمی و آسیب-های بافت کبد به دوز وابسته بوده و سم تری-سیکلازول می‌تواند سیستم متابولیتی بدن را به شکل جبران‌ناپذیری مختل نماید (۱۵). با توجه به مصرف فراوان سم تری‌سیکلازول در مزارع برنج و باغ مرکبات به‌ویژه در مناطق شمال کشور ایران و ضرر احتمالی آن‌ها، محققین درصدد برآمدند تا تأثیر تیموکینون را به‌عنوان یک پروتکتیو، روی روند اسپرماتوژنزیز در رت مورد بررسی قرار دهند.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تجربی، تعداد ۴۲ سر موش سفید صحرایی نر با وزن تقریبی ۲۵۰-۱۸۰ گرم از پژوهشکده‌ی شمال انستیتو پاستور ایران خریداری گردید. حیوانات در اتاق حیوانات با رطوبت نسبی ۵۵ درصد و دمای ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از یک دوره انطباق، موش‌ها به‌طور تصادفی به ۷ گروه (در هر گروه ۶ سر) تقسیم شدند.

گروه کنترل (Cnt): گروهی که هیچ تزریقی در آن صورت نگرفت.

گروه شم (Shm): توئین ۸۰، ۱۰ درصد به‌عنوان حلال TRZ دریافت کرد. لازم به توضیح است به‌منظور حل کردن داروها از محلول ۱۰٪ توئین ۸۰ استفاده‌شده است.

گروه (Beam): گروهی که تری‌سیکلازول را با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کرد.

گروه (T10): گروهی که تیموکینون را با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کرد.

گروه (T20): گروهی که تیموکینون را با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کرد.

گروه (BT20): گروهی که تیموکینون را با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و تری‌سیکلازول را با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کرد.

گروه (BT10): گروهی که تیموکینون را با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و تری‌سیکلازول را با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کرد.

لازم به ذکر است همه‌ی گروه‌ها، مکمل‌ها را به‌صورت روزانه و تزریق درون صفاقی (IP) (پنج روز تزریق ۲ روز استراحت) به مدت ۱ ماه دریافت کردند. وزن بدن هر گروه در روز اول تیمار و در زمان نمونه‌گیری با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. در پایان دوره‌ی تیمار، پس از

بی‌هوش کردن حیوانات با اتر؛ به روش آرام و با رعایت اخلاق در پژوهش، قربانی شدند. سپس در کوتاه‌ترین زمان پوست ناحیه اسکروتوم را موزدایی و استریل نموده بیضه‌ها خارج شدند بیضه‌های راست برای بررسی بافتی و بیضه‌های چپ برای بیان ژن در نظر گرفته شدند. نمونه‌های بافتی بیضه به مدت ۲۴ ساعت در داخل محلول بوئن و در دمای اتاق قرار داده شد تا کاملاً فیکس شوند. هم‌چنین اپیدیدیم از بیضه‌ها جداشده و در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت T6 (توفیق دارو، ایران) به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور CO2 قرار داده شد پارامترهای اسپرمی با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار داده شد. از بافت بیضه بلوک‌های پارافینی تهیه‌شده و برش‌هایی سریالی به ضخامت ۵ میکرون تهیه شد. تمامی برش‌های بافتی را کنار هم قرار داده و با در نظر گرفتن Inter wall روتین، تعداد ۳ تا ۵ برش روی لام ها قرار گرفت تا آماده رنگ‌آمیزی شوند. پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین سلول‌های اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه (رشته‌های متراکم کروماتین) و اسپرماتیدهای گرد (کلاهک آکروزوم)، ارزیابی شد. با استفاده از نرم‌افزار Motic، تعداد رده‌های سلولی در واحد سطح مشخص شد و در گروه‌های مختلف با یکدیگر مقایسه گردید. بعد از انجام پروسه تهیه بافت، لام‌های میکروسکوپی مورد ارزیابی قرار گرفتند. تجزیه‌وتحلیل بیوانفورماتیک و رایانه با استفاده از نرم‌افزار SPSS و Excel 2017 انجام شد. در این مطالعه از آزمون آماری One-way ANOVA Tukey-post Hoc-test با درجه آزادی (آلفا) ۰/۰۵ استفاده‌شده است.

نتایج

شکل‌های ۱ و ۲ مربوط به مقطع عرضی تهیه‌شده از بیضه موش‌ها در گروه‌های مختلف مورد آزمایش می‌باشد. در هر دو شکل به دلیل عدم وجود تفاوت در شاخص‌ها و به‌منظور تقارن شکل؛ به‌جای گروه کنترل صرفاً گروه شم نمایش داده شده است. در شکل ۲ مسیر اسپرماتوژنز در گروه‌های مختلف قابل‌مشاهده است. چنانچه از شکل‌ها قابل‌مشاهده است، در گروه Beam و سایر گروه‌های تیماری BT10 و BT20 به‌وضوح می‌توان تفاوت‌هایی را در قطر، تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی (ژرمینال)، محل قرارگیری سلول‌های ژرمینال که به جداره خارجی لوله‌ها نزدیک شده‌اند و همچنین تغییر در سلول‌های اسپرماتید گرد و کشیده را مشاهده نمود. درواقع می‌توان فرضیه H1 در خصوص تأثیر مخرب تری-سیکلازول را با استفاده از عکس (2D) تأیید نمود.

ارزیابی وزن اولیه بدن: ارزیابی تفاوت میانگین وزن اولیه در بدن رت‌های نر، نشان داد که بین گروه‌های هفت‌گانه، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

ارزیابی وزن نهایی بدن: ارزیابی تفاوت میانگین وزن نهایی در بدن رت‌های نر، نشان داد که بین گروه‌های هفت‌گانه، تفاوت‌معنی‌داری وجود نداشت.

ارزیابی وزن بیضه: ارزیابی تفاوت میانگین وزن بیضه رت‌های نر، نشان داد که بین گروه‌های هفت‌گانه، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

ارزیابی نسبت وزن بیضه/وزن بدن: ارزیابی تفاوت میانگین نسبت وزن بیضه/وزن بدن رت‌های نر، نشان داد که بین گروه‌های هفت‌گانه، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

تعداد اسپرم: بررسی تفاوت میانگین تعداد اسپرم مشخص نمود که بین میانگین تعداد اسپرم در گروه Beam و گروه BT20 ($P <$ ۰/۰۱) و گروه BT10 ($P <$ ۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل و شم کاهش

معناداری وجود دارد، درحالی‌که بین سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

تحرک اسپرم: بررسی تفاوت میانگین تحرک اسپرم مشخص نمود که بین تحرک اسپرم در گروه Beam و گروه BT20 و BT10 (P <۰/۰۰۱) نسبت به گروه کنترل و شم کاهش معناداری وجود دارد همچنین میانگین تحرک اسپرم در گروه Beam نسبت به گروه‌های BT20 (p < ۰/۰۵) و گروه BT10 (p <۰/۰۱)، کاهش معناداری پیدا کرده است.

مرگ‌ومیر اسپرم: بررسی تفاوت میانگین مرگ‌ومیر اسپرم مشخص نمود که بین میانگین مرگ‌ومیر اسپرم در گروه Beam و گروه BT20 (p <۰/۰۱) و گروه BT10 (p <۰/۰۵) نسبت به گروه‌های کنترل و شم افزایش معناداری وجود دارد، همچنین میانگین مرگ‌ومیر اسپرم در گروه Beam با گروه BT10 (p <۰/۰۵) افزایش معناداری پیدا کرده است.

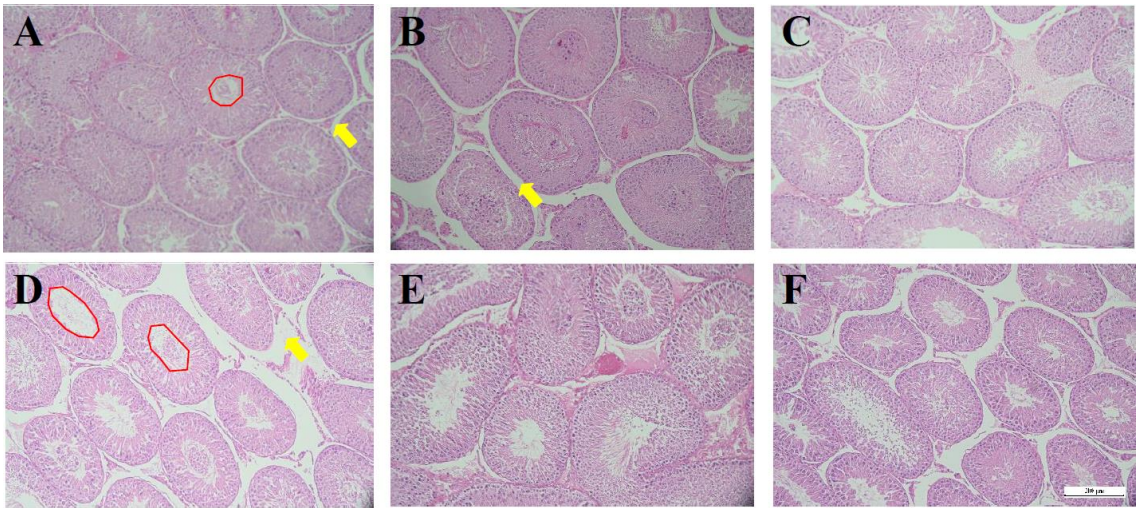
مورفولوژی اسپرم: بررسی تفاوت میانگین مورفولوژی اسپرم مشخص نمود که بین میانگین مورفولوژی اسپرم در گروه Beam (p <۰/۰۱) نسبت به گروه کنترل و شم کاهش معناداری وجود دارد و همچنین بین میانگین مورفولوژی اسپرم در گروه آزمون Beam با گروه BT10 (p <۰/۰۵)، تفاوت معناداری به‌صورت کاهشی پیدا کرده است.

ارزیابی تعداد سلول‌های لیدیگ: بررسی تفاوت میانگین تعداد سلول‌های لیدیگ مشخص نمود که بین میانگین تعداد سلول‌ها در گروه‌های کنترل و شم با گروه‌های آزمون BT20 و BT10 (p <۰/۰۵) افزایش معناداری وجود دارد، درحالی‌که تفاوت معناداری بین سایر گروه‌ها وجود نداشت.

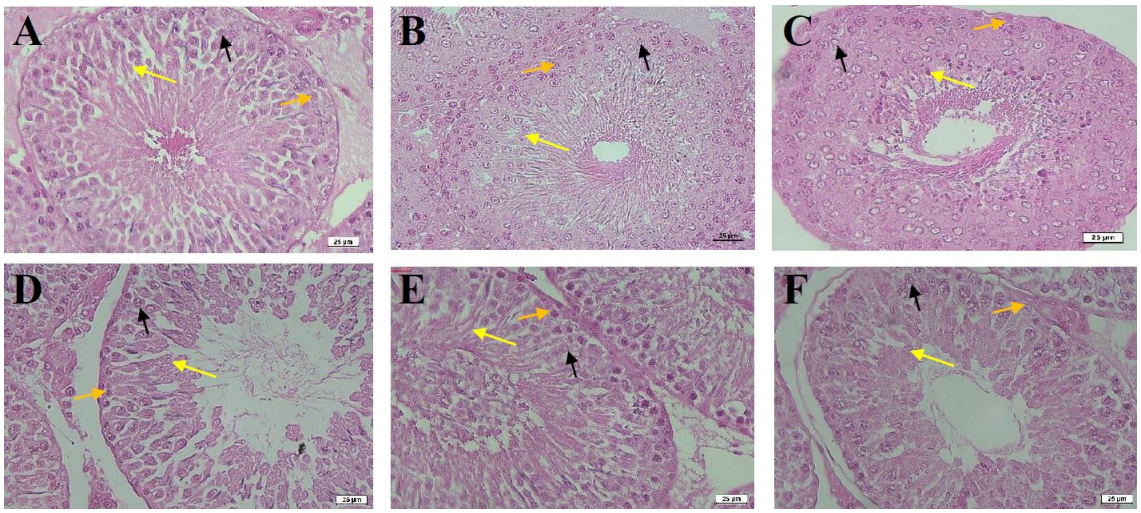
ارزیابی تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی: بررسی تفاوت میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی مشخص نمود که بین میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه کنترل و شم با گروه‌های آزمون Beam، BT20 و BT10 (p <۰/۰۵) تفاوت معنی‌داری به‌صورت کاهشی وجود دارد.

ارزیابی تعداد اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه: ارزیابی تفاوت میانگین تعداد اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه موش‌های صحرایی نر، نشان داد که بین گروه‌های هفت‌گانه، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

ارزیابی تعداد اسپرماتید: ارزیابی تفاوت میانگین تعداد اسپرماتید موش‌های صحرایی نر، نشان داد که بین گروه‌های هفت‌گانه، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.



شکل ۱- میکروگراف‌های بیضه موش‌های صحرایی. (A): شم. (B): گروه دریافت‌کننده تیموکینون با دوز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم. (C): گروه دریافت‌کننده تیموکینون با دوز ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم. (D): گروه دریافت‌کننده تریسیکلازول با دوز ۲۰ میلی-گرم/کیلوگرم. (E): گروه دریافت‌کننده تیموکینون با دوز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و تریسیکلازول با دوز ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم. (F): گروه دریافت‌کننده تیموکینون با دوز ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و تریسیکلازول با دوز ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم. در شکل قطر لومن لوله‌های اسپرم‌ساز با چندوجهی قرمزرنگ مشخص شده. همچنین فلش زردرنگ نشان‌دهنده فضای بین لوله‌های اسپرم‌ساز می‌باشد. بزرگنمایی ۱۰۰X



شکل ۲- میکروگراف بیضه موش‌های صحرایی. در شکل سلول‌های اسپرماتوگونی (فلش‌های نارنجی)، اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه (فلش‌های مشکی) و سلول‌های اسپرماتید (فلش‌های زرد) قابل‌مشاهده می‌باشد. تغییرات مربوط به لوله‌های اسپرم‌ساز، تغییر در قطر لوله‌ها و فضای بین آن‌ها، تغییر در تعداد سلول‌ها قابل‌مشاهده است. بزرگنمایی ۴۰۰X، Shm (A)، T10 (B)، T20 (C)، Beam (D)، BT10 (E) و BT20 (F)

جدول ۱- شاخص‌های وزن حیوانات در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (میانگین ±انحراف معیار)

پارامتر/گروه	نسبت وزن بیضه/وزن بدن (درصد)	وزن بیضه (گرم)	وزن نهایی بدن (گرم)	وزن اولیه بدن (گرم)
کنترل	۰/۶۳۹ ± ۰/۰۴۱	۱/۶۳ ± ۰/۱۴۸	۲۵۵ ± ۱۷/۵	۲۰۴ ± ۱۵/۸
شم	۰/۶۴۷ ± ۰/۰۸۲	۱/۶۶ ± ۰/۱۲۰	۲۵۸ ± ۲۱/۶	۲۰۳ ± ۲۴/۲
Beam	۰/۷۲۲ ± ۰/۲۳۲	۱/۷۵ ± ۰/۴۱۹	۲۴۸ ± ۲۶/۶	۲۰۸ ±۱۲/۹
T10	۰/۶۳۰ ± ۰/۱۰۲	۱/۶۴ ± ۰/۳۳۰	۲۶۰ ± ۱۴/۸	۲۰۳ ± ۱۴/۳
T20	۰/۶۴۰ ± ۰/۱۰۹	۱/۶۹ ± ۰/۳۱۰	۲۶۳ ± ۱۵/۸	۲۰۴ ± ۱۵/۳
BT20	۰/۷۱۹ ± ۰/۱۳۱	۱/۷۹ ± ۰/۲۹۶	۲۵۰ ± ۱۴/۵	۲۰۵ ± ۱۲/۸
BT10	۰/۶۸۷ ± ۰/۱۲۷	۱/۷۱ ± ۰/۳۶۲	۲۴۹ ± ۲۷/۳	۲۰۳ ± ۱۳/۳

جدول ۲- شاخص‌های آنالیز اسپرم در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (میانگین±انحراف معیار)

پارامتر/گروه	مورفولوژی اسپرم (درصد)	مرگ‌ومیر اسپرم (درصد)	تحرک اسپرم (درصد)	تعداد اسپرم (تعداد در میلی‌متر مربع)
کنترل	۸۲/۸ ± ۴/۷۹۲	۱۷/۳ ± ۴/۰۳	۸۷/۰ ± ۵/۰۶	۵۴/۲ ± ۳/۳۷
شم	۸۲/۳ ± ۵/۳۵۴	۱۷/۰ ± ۲/۷۶	۸۷/۲ ± ۵/۷۸	۵۴/۸ ± ۳/۷۱
Beam	**۷۱/۲ ± ۸/۹۷۶	***۲۸/۵ ± ۲/۸۸	***۴۷/۲ ± ۷/۱۱	**۴۰/۸ ±۷/۶۳
T10	۸۱/۷ ± ۴/۹۶۷	۱۴/۵ ± ۳/۱۵	۸۶/۸ ± ۴/۹۶	۵۳/۰ ± ۳/۲۹
T20	۸۲/۳ ± ۴/۱۷۹	۱۹/۵ ± ۴/۰۹	۸۶/۰ ± ۶/۱۶	۵۵/۲ ± ۴/۰۲
BT20	۷۶/۸ ± ۸/۴۲۴	***۲۸/۲ ± ۴/۶۷	***†۶۱/۲ ± ۱۰/۲۵	**۴۴/۳ ± ۵/۷۵
BT10	†۸۰/۵ ± ۸/۴۰۸	*†۲۳/۳ ± ۶/۰۹	***††۶۵/۲ ± ۸/۲۸	*۴۷/۲ ± ۵/۵۶

* تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵،**تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۱،***تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱(نسبت به گروه کنترل) † تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵،††تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ (نسبت به گروه آزمون ۱)

جدول ۳- تعداد سلول‌های اسپرماتید، اسپرماتوسیت، اسپرماتوگونی و لایدیگ بر مبنای تعداد در هر میلی‌متر مربع در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (میانگین ± انحراف معیار)

پارامتر/گروه	تعداد اسپرماتید	تعداد اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه	تعداد سلول‌های اسپرماتوگونیا	تعداد سلول‌های لیدیگ
کنترل	۱۶۱/۸ ± ۳۴/۷	۴۹/۳۳ ± ۸/۱۴	۸/۶۷ ± ۰/۶۴	۷/۸۸ ± ۰/۹۸
شم	۱۵۶/۳ ± ۳۹/۰	۴۹/۰۰ ± ۶/۶۶	۸/۶۰ ± ۰/۷۲	۷/۶۰ ± ۰/۸۹
Beam	۱۳۹/۲ ± ۱۴/۵	۴۲/۰۵ ± ۷/۳۵	*۶/۹۳ ± ۱/۸۲	۹/۶۵ ± ۳/۶۳
T10	۱۶۰/۰ ± ۲۴/۷	۴۹/۹۵ ± ۹/۱۶	۷/۸۰ ± ۱/۵۶	۷/۴۲ ± ۲/۷۳
T20	۱۵۹/۰ ± ۲۰/۳	۴۸/۳۳ ± ۱۱/۹۸	۸/۲۰ ± ۱/۹۲	۷/۹۲ ± ۲/۲۶
BT20	۱۴۴/۰ ± ۱۷/۱	۳۸/۷۵ ± ۵/۷۱	*۷/۱۲ ± ۱/۹۱	*۸/۶۸ ± ۱/۲۷
BT10	۱۴۹/۰ ± ۹/۱	۴۴/۳۳ ± ۹/۸۲	*۷/۴۲ ± ۱/۴۱	*۹/۲۳ ± ۰/۹۸

* تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵،**تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۱،***تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱

بحث

طبق یافته‌های تحقیق حاضر، ارزیابی تفاوت میانگین وزن اولیه بدن، وزن نهایی بدن، وزن بیضه، نسبت وزن بیضه/وزن بدن، تعداد اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه، تعداد اسپرماتید موش‌های سفید صحرایی نر، حاکی از آن بوده که بین گروه‌های هفتگانه، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت؛ اما در تعداد، تحرک،

مرگ‌ومیر و مورفولوژی اسپرم و تعداد سلول‌های لیدیگ و اسپرماتوگونی تفاوت معناداری وجود داشت. در پژوهش دیگری که توسط شریعت‌زاده و همکاران (۲۴) و در مورد اثر حفاظتی روغن سیاه‌دانه بر بافت بیضه و پارامترهای اسپرم در موش‌های صحرایی بالغ تیمار شده با پارانونایل فنل، انجام گرفت، نتایج نشان داد که کاهش معنی‌داری در تحرک، قابلیت حیات، تعداد، مورفولوژی طبیعی اسپرم، قطر لوله‌های منی‌ساز و ضخامت اپیتلیوم زایشی و افزایش معنی‌داری در قطر لومن و سطوح مالون دی آلدئید در گروه پارانونایل فنل نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. پارامترهای فوق در گروه پارانونایل فنل + روغن سیاه‌دانه در مقایسه با گروه پارانونایل فنل بطور معناداری توسط روغن سیاه‌دانه جبران شد. طبق نتایج پژوهش حاضر، بین میانگین تعداد اسپرم در گروه‌های کنترل و شم با گروه‌های آزمون Beam، BT20 و گروه آزمون BT10 تفاوت معنی‌داری به‌صورت کاهشی وجود داشت. بین میانگین تحرک اسپرم در گروه‌های کنترل و شم با گروه‌های آزمون Beam، BT20 و BT10 تفاوت و بین میانگین تحرک اسپرم در گروه آزمون Beam با گروه آزمون BT20 و گروه آزمون BT10، تفاوت معنی‌داری به‌صورت کاهشی وجود داشت.

نتایج پژوهش فاضلیان و همکارانش (۹) نشان داد که با به کار بردن تیموکینون، تعداد اسپرم‌های غیر پیش‌رونده و بی‌حرکت کاهش یافت؛ اما درصد اسپرم‌های زنده تغییر نکرد. نتیجه نهایی اینکه، تیموکینون در دوزهای پایین می‌تواند تحرک اسپرم‌ها را در محیط کشت افزایش دهد. در پژوهشی که توسط عبدالرحمان و کامارزامان (۲) انجام شد، عصاره سیاه‌دانه باعث کاهش درصد درمان پس از سیکلوفسفامید سرم غیرطبیعی اسپرم و حفظ ترشح طبیعی کروماتین شده که نشان‌دهنده حمایت از تغییر DNA اسپرم است. این مطالعه نشان‌دهنده پتانسیل سیاه‌دانه و تیموکینون به‌عنوان پیشگیری در برابر آسیب ناشی از سیکلوفسفامید به گامت در تلاش برای نجات عمل تولیدمثل پس از شیمی‌درمانی بوده - است.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بین میانگین تعداد سلول‌های لیدیگ در گروه Shm و Cnt با گروه‌های آزمون BT20 و BT10، تفاوت معنی‌داری به‌صورت افزایشی وجود داشت. تری‌سیکلازول میزان تستوسترون، فاصله آنوژنیتال و وزن بیضه را کاهش می‌دهند و منجر به هیپاتومگالی و کاهش باروری می‌شوند (۱۱، ۱۳).

برخی از محققان بر این باورند که تری‌سیکلازول هیچ تأثیری روی وزن بیضه ندارد، ولی باعث بزرگ شدن بیش‌ازحد (هیپرتروفی) کبد می‌شود و بیان ژن سیتوکروم (مانند سیتوکروم P450) را مهار می‌کند (۲۷).

سم تری‌سیکلازول در تولید برخی ترکیبات در بدن مداخله می‌کند و بعضی‌اوقات باعث افزایش‌تری گلیسیرید، کلسترول، گلوکز و لاکتات خون می‌شود. به‌علاوه، بالا رفتن میزان آلانین آمینوتراسنفراز و آسپارتات آمینوتراسنفراز و کاهش آلکالین فسفاتاز ازجمله عوارض شدید این ترکیب هستند (۲۳).

محققین دیگری معتقدند استفاده طولانی‌مدت از تری- سیکلازول وزن بیضه، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و در نهایت تعداد و تحرک اسپرم‌ها را کاهش می‌دهد (۲۱).

مطالعه الابیاری و همکاران (۷) نشان داد که تزریق CdCl2 باعث اختلال ساختاری مشخص در لوله‌های منی ساز موش صحرایی می‌شود و همچنین باعث کاهش قابل‌توجه اسپرماتوژنز می‌شود. سیاه‌دانه علاوه بر حفظ اسپرماتوژنز، تزریق هم‌زمان روغن سیاه‌دانه و CdCl2 باعث کاهش قابل‌توجهی در تغییرات

ساختاری بیضه موش‌های تغذیه‌شده با CdCl2 می‌شود.

همچنین نتایج پژوهش عبدالرحمان و همکارانش (۱) و در خصوص اثر مکمل تیموکینون بر تغییرات در تولیدمثل موش نر، نشان داد که اختلاف معنی‌داری در وزن بیضه موش در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه شم دیده شد. ساختار بافت بیضه نیز در گروه‌های آزمایشی تغییرات کمی را نشان داد. نتایج نهایی تحقیق حاضر نشان داد که بین میانگین مرگ‌ومیر اسپرم در گروه‌های کنترل و شم با گروه‌های آزمون Beam، BT20 و گروه آزمون BT10 و بین میانگین مرگ‌ومیر اسپرم در گروه آزمون Beam با گروه آزمون BT10، تفاوت معنی‌داری به‌صورت افزایشی وجود داشت. بین میانگین مورفولوژی اسپرم در گروه‌های کنترل و شم با گروه آزمون Beam و بین میانگین مورفولوژی اسپرم در گروه آزمون Beam با گروه آزمون BT10، تفاوت معنی‌داری به‌صورت کاهشی وجود داشت. بین میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه Shm و Cnt با گروه‌های آزمون Beam، BT20 و BT10 تفاوت معنی‌داری به‌صورت کاهشی وجود داشت، درحالی‌که بین سایر گروه‌ها، برای شاخص‌های مذکور تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. اسیدهای چرب غیراشباع در روغن سیاه‌دانه فعالیت آنزیم β- هیدروکسی استروئید دهیدروژناز را تحریک می‌کند. این آنزیم، در مسیر سنتز تستوسترون نقش دارد. همچنین سیاه‌دانه به‌عنوان آنتی‌اکسیدان روی بیضه، غدد ضمیمه، اپیدیدیم و اسپرم اثر می‌گذارد و از آسیب رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند (۶، ۱۹، ۲۶).

نتایج پژوهش السعیدی و همکاران (۳) نتایج نشان داد که درمان با عصاره الکلی سیاه‌دانه موجب افزایش وزن، قطر لوله‌های اسپرماتوژنیک، تعداد اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه، اسپرماتیدها، اسپرم‌های آزاد گردید. آن‌ها نتیجه گرفتند که عصاره الکلی سیاه‌دانه باعث بهبودی باروری در موش‌های صحرایی می‌شود.

نتایج پژوهش محمدی می‌آبادی و همکارانش (۱) نشان داد که عصاره دانه کرچک باعث کاهش معنی‌داری در سلول‌های رده اسپرمی و میزان هورمون‌های جنسی می‌شود. میزان بی‌اثر شدن (از حالت طبیعی خارج شدن) DNAی اسپرمی در غلظت‌های بالاتر افزایش می‌یابد. در نتیجه این عصاره می‌تواند بر باروری تأثیر داشته و آن را کاهش دهد.

نتیجه‌گیری

در این بررسی بیشترین میانگین تعداد اسپرم (۵۵/۲) در گروه T20، بیشترین میانگین درصد تحرک اسپرم (۸۷/۲) در گروه شم، بیشترین میانگین میزان مرگ‌ومیر اسپرم (۲۸/۵) در گروه Beam، بیشترین میانگین مورفولوژی اسپرم (۸۲/۸) در گروه کنترل، بیشترین میانگین تعداد سلول‌های لیدیگ (۹/۶۵) در گروه Beam و بیشترین میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی (۸/۶۷) در گروه کنترل نشان داده شد؛ بنابراین می‌توان تیموکینون را به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی که می‌تواند سمیت ناشی از سم تری‌سیکلازول بر فرآیند اسپرماتوژنز را تا حدودی جبران نماید، معرفی کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر اساس نتایج تحقیقات رساله دکتری در پاییز ۱۴۰۰ در دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آیت ا... آملی تهیه شده است. از کلیه‌ی همکارانی که ما را در انجام این تحقیق یاری رساندند، کمال تشکر را داریم.

منابع

1. Abdul-Rahman S., Mohamed Anwar Norul A., Basha Shaik S., Kamarzaman S. 2014. Impact of thymoquinone supplementation on immobilisation stress-

induced. *Journal of Applied and Natural Science*, 6(1): 1-5.

2. Abdul-Rahman S., Kamarzaman S. 2017. Prophylactic Effects of Nigella sativa Extract and Thymoquinone against Cyclophosphamide-induced Sperm Head Abnormalities and Chromatin Instability in Mice, Bulletin of Environment, *Pharmacology and Life Sciences*, 6(10):5-16.

3. Al-Sa'aidi J.A.A, Al-Khuzai A.L.D, Al-Zobaydi N.F.H. 2009. Effect of alcoholic extract of Nigella sativa on fertility in male rats, *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 23(Supplement II): 123-128.

4. Alimondegari M., Karimi M., Razeghi Nasrabad H. 2021. Infertility and Coping Strategies in Men and Women Referring to Yazd Institute of Reproductive Sciences. *Journal of Family Research*, 16(4):473-492 [In Persian].

5. Allen J., Wolf D., George M., Hester S., Sun G., Thai S., Delker D., Moore T., Jones C., Nelson G., Roop B., Leavitt S., Winkfield E.,Ward W., and Nesnow S., 2006. Toxicity profiles in mice treated with hepatotumorigenic and non-hepatotumorigenic triazole conazole fungicides: *propiconazole, triadimefon, and myclobutanil. Toxicologic Pathology*, 34(7): 853-862.

6. Bashandy S. 2007. Effect of Fixed Oil of Nigella Sativa on male fertility in normal and hyperlipidemic rats. *International Journal of Pharmacology*, 3(1):27-33.

7. El-Ebiary Ahmad A., Shahin Marwa M., Hantash Ehab M. 2015. Protective role of *Nigella sativa* oil on spermatogenesis and testicular structure in cadmium intoxicated rats. Ain Shams *Journal of Forensic Medicine and Clinical Toxicology*, 25: 71-80.

8. Fattahi E., Mousavi Moghadam M., Khanbabaei R. 2015. The Effect of Tricyclazole on Testosterone Changes and Testicular Structure in Mice. *Journal of Babol University of Medical Sciences*, 17(2):43-49. [In Persian]

9. Fazelian K., Dashti G., Golshan Iranpour F., Baghazadeh S. 2014. Effects of Low Doses of Exogenous Thymoquinone on Sperm Motility and Viability of Normozoospermic Men. *Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 32(287): 776-783. [In Persian]

10. Gali-Muhtasib H., El-Najjar N., Schneider - Stock R. 2006. The medicinal potential of Black seed (*Nigella Sativa*) and its components. *Advanced Phytomedicine*, 2: 133-153.

11. Goetz A.K., Ren H., Schmid J.E., Blystone C.R., Thillainadarajah I., Best D.S., Nichols H.P., Strader L.F., Wolf D.C., Narotsky M.G., Rockett J.C., Dix D.J. 2007. Disruption of testosterone homeostasis as a mode of action for the reproductive toxicity of triazole fungicides in the male rat. *Toxicological Sciences*, 95(1):227-239.

12. Gribins K.M. 2011. Reptilian spermatogenesis, a histological and ultrastructural perspective. *Spermatogenesis*, 1(3): 250-269.

13. Hester S., Moore T., Padgett WT., Murphy L., Wood CE., Nesnow S. 2012. The hepatocarcinogenic conazoles: *cyproconazole*, *epoxiconazole*, and *propiconazole* induce a common set of toxicological and transcriptional responses. *Toxicological Scieces*, 127(1):54-65.

14. Khaki A., Nouri M., Fathi Azad F., Khaki A.A. 2008. Evaluation of Zingiber Officinalis and Allium Cepa on Spermatogenesis in Rat. *Journal of Tabriz University of Medical Sciences*, 30: 53-58.

15. Knez J. 2013. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. *Reprod Biomed Online*, 26(5):440-448.

16. Labadie P., Budzinski H. 2006. Alteration of steroid hormone balance in juvenile turbot (Psetta maxima) exposed to nonylphenol, bisphenol A, tetra

Immunopharmacology, 5(13-14):1749-1770.

23. Sancho E., Fernández-Vega C., Villarroel M.A., Andreu-Moliner E., Ferrando M.A. 2009. Physiological effects of tricyclazole on zebrafish (Danio rerio) and post-exposure recovery. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology and Pharmacology*, 150(1):25-32.

24. Shariatzadeh M., Keikha L. 2015. Evaluation of the Protective Effect of Nigella Sativa Oil on Testicular Tissue and Sperm Parameters in Adult NMRI Mice Treated with Para-nonylphenol. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 23(2):1927-1944. [In Persian]

25. Sharma N.K., Ahirwar D., Jhade D., Gupta S. 2009. Medicinal and pharmacological potential of Nigella sativa.A review. *Ethnobotanical Review*, 13: 946-955.

26. Tawfeek F.K.H., Ahmed S.M., Kakel S.J. 2006. Effect of Nigella sativa Oil Treatment on the Sex organs and Sperm Charactors in Rats Exposed to Hydrogen Peroxide. *Mesopotamia Journal of Agriculture*, 34(1):1-7.

27. Tully D.B., Bao W., Goetz A.K., Blystone C.R., Ren H., Schmid JE., Strader LF., Wood C.R., Best DS., Narotsky MG. 2006. Gene expression profiling in liver and testis of rats to characterize the toxicity of triazole fungicides. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 215: 260-273.

bromodiphenyl ether 47, diallylphthalate, oil, and oil spiked with alkylphenols. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50(4):552-561.

17. Marotta F., Tiboni G.M. 2010. Molecular aspects of azoles-induced teratogenesis. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 6:461-482.

18. Mohammadi F., Nikzad H., Taherian A., Amini Mahabadi J., Salehi M. 2013. Effects of herbal medicine on male infertility. *Anatomical Sciences*, 10: 3-16.

19. Mohammad Mukhallad A., Mohamad Mohamad MJ., Dradka H. 2009. Effects of Black Seeds (*Nigella sativa*) on Spermatogenesis and Fertility of Male Albino Rats, *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 4(2): 386-390.

20. Osama Badary A., Abdel-Naim A.B., Abdel-Wahab M.H., Hamada F.M. 2000. The influence of thymoquinone on doxorubicin – induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology*, 143: 219-226.

21. Ravi Kumar P., Kanniapan M., Mathuram L.N., Selvasubramanian S., Murali Manohar B., Sriram P. 2011. Hexaconazole induced change in the histological architecture of male and female reproductive system in rats. *Research Journal of Pharmacology*, 5(2):9-13.

22. Salem M.L. 2005. Immunomodulatory and therapeutic properties of the Nigella sativa L. seed. *International Journal of*

Investigating the Protective Effect of Thymoquinone on the Process of Spermatogenesis and Functional Indices of Sperm in White Rats Receiving Tricyclazole

Ramona Kasra Kermanshahi[1], Esmail Fattahy[1]*, Seyed Gholam Ali Jorsaraei[2], Sohrab Kazemi[3], Maryam Gholamitabar Tabari[4]

1- Department of Biology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
2- Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
3-Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
4- Health Reproductive Research Center, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

Abstract

Compounds with antioxidant properties such as thymoquinone (TQ) significantly prevent changes resulting from the effect of toxic chemicals such as tricyclazole on visceral organs. Therefore, this study was conducted in order to use thymoquinone to prevent the destructive effects of tricyclazole on the process of spermatogenesis in male rats. In this experimental study, 42 male rats were randomly divided into 7 groups including: control group (no drug), sham group (10% solution of Tween 80), tricyclazole (20 mg/kg) group, thymoquinone (10 mg/kg) group, thymoquinone (20 mg/kg) group, tricyclazole (20 mg/kg) + thymoquinone (10 mg/kg) group, and tricyclazole (20 mg/kg) + thymoquinone (20 mg/kg) group. At the end of the treatment period, by preparing tissue sections from the testis, the cells of the spermatogenesis pathway were evaluated per unit area. According to the findings, the average number and motility of sperm and the number of spermatogonial cells in the thymoquinone 20 and thymoquinone 10 groups showed a significant increase compared to the tricyclazole group ($p < 0.05$); However, the number of Leydig cells in the thymoquinone 20 and thymoquinone 10 groups showed a significant decrease compared to the tricyclazole group ($p < 0.05$). The results of the study showed that thymoquinone, as a strong antioxidant, can partially compensate for the toxicity caused by tricyclazole on the spermatogenesis process.

Keywords: Thymoquinone, Spermatogenesis, Tricyclazole Toxin, Antioxidant.