مطالعه اثرات محافظتی پودر کدو بر آسیب بافت بیضه جنین موش‌های صحرائی حاصل از مادران دیابتی شده با آلوکسان

سیدسجاد حجازی[1*]، فاطمه افشاری[2]

۱- استادیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- استادیار گروه علوم پایه، دانشکده پزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: sajjad.hejazi@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۳/۵/۲۷ پذیرش نهایی: ۹۳/۷/۲۸)

چکیده

بروز ناهنجاری در ارگان‌های مختلف جنین و نوزادان حاصل از مادران دیابتی امروزه به‌خوبی ثابت شده است. با توجه به صدمات برگشت‌ناپذیر این بیماری در سیستم تولید مثل نوزادان، هر اقدامی که در جهت کاهش این ناهنجاری‌ها صورت پذیرد از اهمیت و ضرورت خاصی برخوردار است. در این مطالعه تجربی اثرات محافظتی پودر کدو در کاهش آسیب بافت بیضه جنین موش‌های صحرایی حاصل از مادران دیابتی بررسی گردید. موش های ماده آبستن به طور تصادفی به ٤ گروه ۱۰ تایی شامل: ۱- گروه تیمار با پودر کدو، ۲- گروه شاهد دیابتی، ۳- گروه درمان (دیابتی شده و تیمار با پودر کدو) و ٤- گروه شاهد سالم تقسیم شدند. مدل تجربی دیابت در موش‌های صحرایی مادر با یک بار تزریق داخل صفاقی آلوکسان منوهیدرات به میزان ۱۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ایجاد شد. در گروه های اول و سوم پودر کدو به مدت ٤ هفته و به میزان ۲ گرم بر کیلوگرم وزن بدن گاواژ شد. تغییرات بافت‌شناسی و مورفومتری شامل وزن، قطر لوله‌های منی‌ساز، تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، سرتولی و لایدیک بین گروه‌های مورد مطالعه مقایسه گردید. برای تحلیل آماری داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد و مقادیر $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. بافت بیضه در گروه شاهد دیابتی کاهش معنی‌داری در تعداد لوله‌های منی‌ساز در مقایسه با گروه شاهد سالم و درمان دیابتی داشت. سلول‌های زایا یا اسپرماتوگونی در گروه شاهد دیابتی حالت دژنره داشته و به‌طور پراکنده و با سیتوپلاسمی واکوئله دیده شدند در حالی‌که، در گروه درمان دیابتی سلول‌های زایا با تعداد زیادتر و سیتوپلاسم عاری از واکوئل مشاهده شدند. کاهش معنی‌داری وزن بیضه در گروه شاهد دیابتی نسبت به گروه درمان دیابتی وجود داشت. در گروه شاهد دیابتی سلول‌های زایا، لایدیگ، سرتولی و قطر لوله‌های منی‌ساز کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داد. در گروه درمان دیابتی، پودر کدو باعث افزایش سلول‌های زایا، لایدیگ، سرتولی و قطر لوله منی‌ساز در مقایسه با گروه درمان دیابتی شد. نتایج نشان داد که پودر کدو بر آسیب بافت بیضه جنین موش‌های صحرائی حاصل از مادران دیابتی شده با آلوکسان دارای اثرات حفاظتی می‌باشد.

کلید واژه‌ها: دیابت، آلوکسان، بیضه، پودر کدو، موش صحرایی.

مقدمه

بیماری دیابت ملیتوس یک بیماری مزمن است که با ارزیابی سطح قند خون مشخص می‌گردد. انتقال گلوکز از راه جفت به جنین از مادران دیابتی زیاد می‌باشد که ناشی از افزایش دسترسی قند در خون مادر است (Hassan *et al*., 2007). وقوع هیپرگلیسمی در مادران آبستن اثرات تخریبی مهمی بر ساختار و عملکرد بیضه جنین می‌گذارد. این صدمات دوره قبل و بعد از بلوغ نوزادان را در بر می‌گیرند (Jelodar *et al*., 2010).

در مطالعات اپیدیولوژیکی ثابت شده است که اثرات دیابت در دوره آبستنی به دوره زندگی بعد از بلوغ و حتی تا نسل‌های آینده کشیده می‌شود. قند خون بالا در مادران دیابتی باعث از بین رفتن سلول‌های بتای پانکراس جنین‌ها می‌شود، به‌طوری‌که پانکراس جنین‌های متولد شده از مادران دیابتی با وقوع دگرانولاسیون در سلول‌های بتا همراه است (Van Assche *et al*., 1983).

بررسی‌های اتنوبوتانیک بیش از ۱۲۰۰ گونه گیاه را گزارش نموده‌اند که ممکن است اثر ضد دیابت داشته باشند (Marles *et al*., 1995).

کدو با نام علمی *Cucurbita pepo* L. متعلق به خانواده کدو Cucurbitaceae می‌باشد. *کوکوربیتا پپو* زیرگونه پپو رقم استیریاکا (Cucurbita pepo sub sp. pepo var. Styriaca) می‌باشد. این گیاه یک‌ساله با ساقه‌های خوابیده بر سطح خاک، برگ‌های تخم‌مرغی، پهن و به بزرگی ۱۵ تا ۳۰ سانتی‌متر و گل‌های زرد پر رنگ، تک‌جنس می‌باشد (Ghasemi-dehkordi *et al*., 2002). این خانواده از نظر شیمیایی دارای تریپترپن‌های تتراسیکلیک، ساپونین‌ها، پروتئین‌ها، فیبرها، پلی‌ساکاریدها و مواد معدنی آهن، روی، منگنز، مس و غیره می‌باشد (Bombardelli *et al*., 1997).

اهمیت وسعت درگیری بیماری دیابت و اثرات ناهنجاری‌زایی در ارگان‌های مختلف جنین و نوزادان حاصل از مادران دیابتی امروزه ثابت می‌باشد و با توجه به اثبات صدمات برگشت ناپذیر این بیماری در سیستم تولید مثل نوزادان و تبعاتی که به نسل‌های آینده دارد، بنابر این هر اقدامی که در جهت کاهش این ناهنجاری‌ها صورت پذیرد از اهمیت و ضرورت خاصی برخوردار خواهد بود. در این تحقیق سعی شد با انجام مطالعه‌ای تجربی اثرات محافظتی پودر کدو در جهت کاهش وقوع نارسائی در بافت بیضه جنین‌های حاصل از موش‌های صحرایی مادر دیابتی ارائه شود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی آزمایشگاهی بوده و در سال ۱۳۹۳ در مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز انجام شد. در این مطالعه کلیه ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های کار روی حیوانات آزمایشگاهی مورد تائید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی بود.

در این مطالعه ٤٠ سر موش صحرائی ماده بالغ و ۱۰ موش صحرائی نر بالغ از نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۰۰ الی ۲۲۰ گرم، استفاده شد . حیوانات در محیط درجه حرارت ۲±۲۲ درجه سلسیوس، رطوبت محیطی ۲±۳۸ درصد، شدت نور در مرکز اتاق ۳۰۰ لوکس و دوره های متوالی ۱۲ ساعته نور و تاریکی به مدت یک هفته نگه‌داری شدند. آب و غذای مناسب (کنسانتره) به اندازه کافی در دسترس حیوانات قرار گرفت. مشاهده پلاک واژنی (پاپ اسمیر)، به‌عنوان روز صفر آبستنی

محسوب شد. سپس موش‌های ماده آبستن به‌طور تصادفی به ٤ گروه ۱۰ تایی شامل: ۱- گروه تیمار با پودر کدو (۲ g/kg)، ۲- گروه شاهد دیابتی (mg/kg ۱۲۰)، ۳- گروه درمان (دیابتی شده و تیمار با پودر کدو) و ٤- گروه شاهد سالم، تقسیم شدند.

آماده‌سازی پودر کدو

به منظور برطرف کردن گرد و خاک از میوه کدو (*Cucurbita pepo*)، میوه‌ها با آب شسته شده و سریعاً خشک گردیدند، تا از آسیب‌دیدگی در هنگام پژمردگی جلوگیری شود. برای سرعت بخشیدن به فرآیند خشک شدن، میوه کدو به صورت ورقه‌های نازکی بریده شد و در یک محل سرپوشیده، با دمای ۳۵ درجه سلسیوس که دارای جریان هوا بود، قرار داده شد و تحت این شرایط طی سه الی پنج روز خشک گردید. پس از خشک شدن، میوه توسط آسیاب برقی به خوبی پودر شد (عسگری و همکاران، ۱۳۸۸).

القاء دیابت

مدل تجربی دیابت قندی نوع ۱ وابسته به انسولین در موش‌های صحرایی مادر با یک بار تزریق داخل صفاقی آلوکسان منوهیدرات (Sigma, Germaney) به میزان ۱۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ایجاد شد و از سرم فیزیولوژی به عنوان حلال آلوکسان استفاده شد (Ugbenyen *et al*., 2009). ۷۲ ساعت بعد از تزریق آلوکسان، با اندازه‌گیری قند خون ناشتای حیوان با استفاده از دستگاه گلوکومتر، دیابتی بودن مشخص شد (Lazos *et al*., 2005). ملاک دیابتی شدن، افزایش میزان گلوکز به بالاتر از ۱۳۰ میلی‌گرم بر دسی-لیتر بود (Quanhong *et al*., 2005). لازم به توضیح است که القاء دیابت قبل از آبستنی در موش‌های ماده انجام پذیرفت.

تجویز پودر کدو

گروه‌های ۱ و ۳ به مدت ٤ هفته پودر کدو را به میزان ۲ گرم بر کیلوگرم وزن بدن از طریق گاواژ دریافت کردند. در هنگام آزمایش پودر کدو در مقدار معین آب مقطر مخلوط شده و سپس از طریق گاواژ به حیوان‌ها تجویز شد. به منظور اطمینان، حدود سه الی چهار ساعت قبل از گاواژ غذا از دسترس حیوان‌ها خارج و فقط آب در اختیار آنها قرار گرفت (عسگری و همکاران، ۱۳۸۸).

روش بررسی

برای هر ٤ موش ماده، یک موش نر بالغ جهت بارورسازی در هر قفس در نظر گرفته شد. زمان مشاهده تشکیل پلاک واژنی (vaginal plug) به‌عنوان روز صفر آبستنی تعیین شد. با احتساب روز صفر آبستنی، ابتدا جنین های ۱۹ روزه از شاخ رحم مادران جدا شده و زیر استریومیکروسکپ مدل نیکون، تعیین جنسیت شده و جنین‌های جنس نر جدا شدند و توسط ترازوی دیجیتال حساس به ۰/۰۱ گرم وزن‌گیری شده و توسط کولیس، طول قدامی-خلفی (CRL) جنین‌ها اندازه‌گیری شد. سپس بیضه‌ها از محوطه شکم جنین‌ها جداسازی شد و توسط ترازوی دیجیتال وزن آنها محاسبه شد. بعد از انجام مراحل آماده‌سازی و پاساژ بافتی، نمونه‌ها با ضخامت ۵ میکرون مقطع زده شدند و به روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شده و در نهایت زیر میکروسکپ نوری مدل نیکون مورد بررسی قرار گرفتند. مورفومتری لوله منی‌ساز توسط عدسی مدرج صورت گرفت. سپس تعداد سلول‌های

اسپرماتوگنی، سلول‌های لایدیگ و سرتولی به کمک یک صفحه مدرج (eye piece) که بر روی عدسی چشمی میکروسکوپ نوری قرار می‌گیرد، مورد شمارش قرار گرفتند.

تحلیل آماری داده‌ها

داده‌ها به صورت میانگین±انحراف استاندارد (mean±SEM) بیان شده و برای تحلیل داده‌ها روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و به دنبال آن تست‌های مقایسه‌ای چند گانه توکی برای مقایسه وجود اختلاف بین گروه‌ها استفاده شد. مقدار $p<۰/۰۵$ برای تعیین سطح معنی‌دار بودن اختلاف بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تغییرات قند خون

استفاده از پودر کدو باعث کاهش میزان قند خون در موش‌های صحرائی دیابتی داشت و از این نظر اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بین گروه شاهد دیابتی و گروه دیابتی تیمار با پودر کدو دیده شد (جدول ۱). هم‌چنین کاهش قند خون در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم و گروه تیمار با پودر کدو معنی دار بود ($p<۰/۰۰۱$).

جدول ۱- مقایسه میانگین قند خون در موش‌های صحرایی گروه‌های مختلف (برحسب میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)

گروه‌ها	شاهد سالم	سالم تیمار با پودر کدو	شاهد دیابتی	دیابتی تیمار با پودر کدو
قند خون	۹٤/۹۸ ± ٦/۰٦ ^{c}	۹۱/۳٤ ±۷/۲۱^{c}	۳۳۸/۱۸ ±۱۲/٤۳^{a}	۲۰۱/۷۸ ±۹/۲۱^{b}

abc: حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

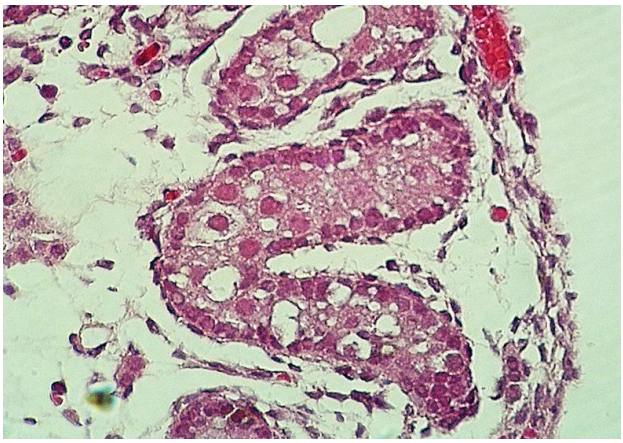
تغییرات بافت‌شناسی

در مطالعه بافت‌شناسی، در گروه شاهد دیابتی کاهش محسوسی در تراکم لوله‌های منی‌ساز در مقایسه با گروه دیابتی تیمار با پودر کدو مشاهده شد. افزایش فضاهای بینابینی در گروه شاهد دیابتی به‌وضوح به چشم می‌خورد. در گروه دیابتی تیمار با پودر کدو تمامی پارامترهای کمی شامل قطر لوله منی‌ساز، تعداد لوله‌های منی‌ساز، تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، سلول‌های لایدیگ، ضخامت کپسول بیضه در مقایسه با گروه شاهد دیابتی اختلاف معنی‌داری نشان داد ولی در اپی‌تلیوم لوله منی‌ساز اختلاف معنی‌داری دیده نشد (جدول ۲). در فضاهای بافت بینابینی بیضه، بافت همبندی سست همراه با عروق خونی و سلول‌های همبندی قابل مشاهده بود. سلول‌های لایدیگ به‌صورت تکی و تجمعات سلولی با هسته‌ای گرد در گوشه سیتوپلاسم و سیتوپلاسمی ائوزینوفیلی قابل مشاهده بودند. سلول‌های میواپی‌تلیال در اطراف لوله‌های منی‌ساز به طور کشیده با هسته‌ای هتروکروماتینی دیده شدند. سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه شاهد دیابتی به طور پراکنده و با سیتوپلاسمی واکوئله دیده شد (شکل ۱ الف)، در حالی که این سلول‌ها در گروه دیابتی تیمار با پودر کدو، با تعدادی بیشتر و اندازه‌ای درشت‌تر نسبت به گروه قبلی مشاهده شد و روند دژنراسیون و حضور واکوئل در سیتوپلاسم سلول‌ها مشاهده نشد (شکل ۱ ب).

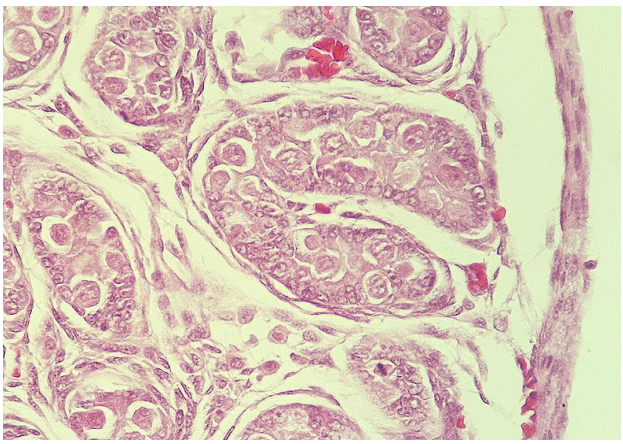
پراکندگی لوله‌های منی‌ساز در گروه شاهد دیابتی بیشتر در پیرامون بافت بیضه دیده شد، در حالی‌که این پراکندگی در گروه دیابتی تیمار با پودر کدو به طور

یکنواخت در بافت بیضه مشاهده شد (شکل ۲ الف، ب). سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه دیابتی تیمار با پودر کدو به طور تصادفی در لوله‌های منی‌ساز درون سلول‌های سرتولی اولیه جاگیری کرده بودند. این سلول‌های درشت با سیتوپلاسمی ائوزینوفیلی و هسته وزیکولی و با چندین هستک در مرکز سلول دیده شدند.

در گروه شاهد دیابتی افزایش ضخامت کپسول بیضه (تونیکا آلبوژینه) و گسترش عروق زیرکپسولی به درون آن دیده شد. به‌هم‌ریختگی اپی‌تلیوم زایای لوله‌های منی‌ساز و ادم ملایم در فضای بینابینی نیز در گروه شاهد دیابتی قابل مشاهده بود (شکل ۳ الف). در گروه دیابتی تیمار با پودر کدو، کاهش ضخامت کپسول بیضه و کاهش گسترش عروق خونی در بافت بیضه دیده شد و وضعیت ساختاری نسبتاً طبیعی در اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز این گروه قابل مشاهده بود (شکل ۳ ب).

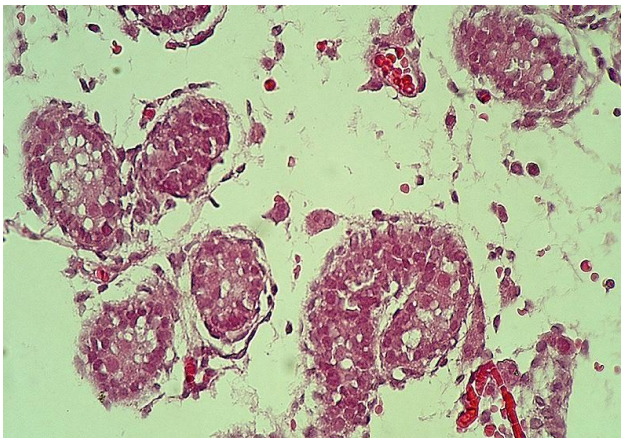


الف

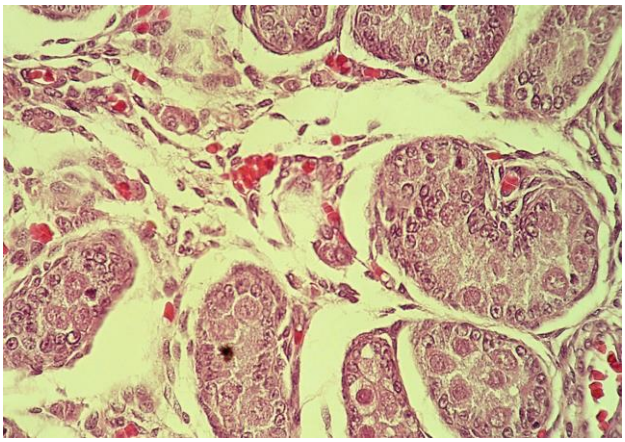


ب

شکل ۱- نمای ریزبینی از مقطع بافت بیضه جنین ۱۹ روزه موش صحرائی، الف) گروه شاهد دیابتی: تغییرات شدید دژنراتیو و روند واکوئوله شدن سیتوپلاسم در سلول‌های اسپرماتوگنی، به‌هم‌ریختگی سلول‌های همبندی کپسول بیضه (تونیکا آلبوژینه) و گسترش فضاهای بینابینی در گروه شاهد دیابتی قابل مشاهده است. ب) گروه دیابتی تیمار با پودر کدو، ساختار نسبتاً طبیعی وضعیت سلول‌های اسپرماتوگونی، کپسول بیضه و تراکم بالای سلولها در فضای بینابینی در گروه دیابتی تیمار با پودر کدو دیده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین–ائوزین، درشتنمایی × ۴۰۰).

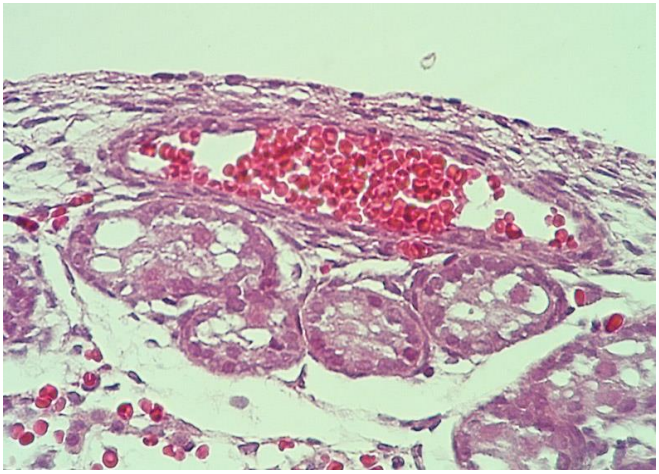


الف

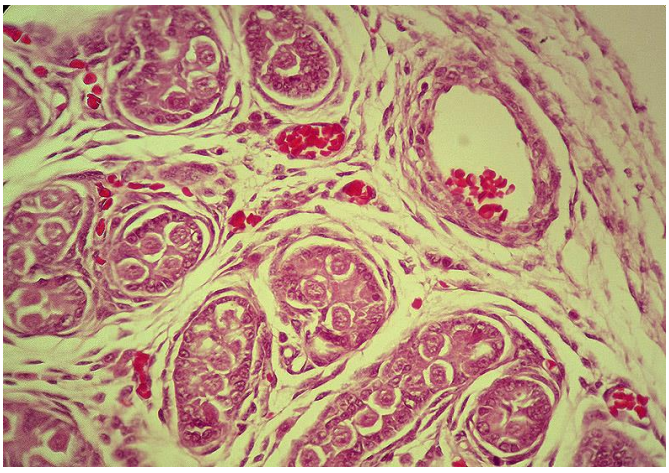


ب

شکل ۲- نمای ریزبینی از مقطع بافت بیضه جنین ۱۹ روزه موش صحرائی، الف) گروه شاهد دیابتی: تغییرات در کاهش قطر و به‌هم‌ریختگی اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز، کاهش سلول‌های لایدیگ، ادم و آماس ملایم در فضاهای بینابینی در گروه شاهد دیابتی قابل مشاهده است. ب) گروه دیابتی تیمار با پودر کدو: اندازه طبیعی قطر و شکل لوله‌های منی‌ساز و وضعیت نرمال سلول‌ها در فضاهای بینابینی در گروه دیابتی تیمار با پودر کدو دیده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین–ائوزین، درشنمایی ×۴۰۰).



الف



ب

شکل ۳- نمای ریزبینی از مقطع بافت بیضه جنین ۱۹ روزه موش صحرائی، الف) گروه شاهد دیابتی: افزایش ضخامت کپسول بیضه (تونیکا آلبوژینه) و گسترش عروق زیر کپسولی به درون تونیکا آلبوژینه، به‌هم‌ریختگی اپی‌تلیوم زایای لوله‌های منی‌ساز و ادم ملایم در فضای بینابینی در گروه شاهد دیابتی قابل مشاهده است. ب) گروه دیابتی تیمار با پودر کدو: کاهش قطر عروق خونی در کپسول بیضه و وضعیت نسبتاً نرمال اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز در گروه دیابتی تیمار با پودر کدو قابل دیده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین–ائوزین، درشتنمایی ×۴۰۰).

تغییرات مورفومتری

اثر بر قطر لوله‌های منی‌ساز: در موش‌های صحرایی گروه دیابتی تیمار با پودر کدو میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز ۱۱/۷۳±۱۸۰/۲۳ میکرومتر، و در گروه شاهد دیابتی ۱۰/۳۶±۱۵۲/۱۹ میکرومتر بود که در مقایسه با هم اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<۰/۰۵$). از سوی دیگر میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز در گروه‌های شاهد سالم و سالم تیمار با پودر کدو اختلاف معنی‌داری با هر دو گروه دیابتی و دیابتی تیمار با پودر کدو داشت (جدول ۲). پودر کدو در موش‌های صحرایی دیابتی باعث افزایش قطر لوله‌های منی‌ساز شد.

اثر بر وزن بیضه: در موش‌های صحرایی گروه دیابتی تیمار با پودر کدو وزن بیضه ۰/۰۴± ۰/۳۸گرم و در گروه شاهد دیابتی ۰/۰۶±۰/۲۶ گرم بود که در مقایسه با هم

اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<۰/۰۵$). میانگین به‌دست آمده از گروه دیابتی تیمار با پودر کدو در مقایسه با گروه‌های شاهد سالم و سالم تیمار با پودر کدو اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۲). پودر کدو در موش‌های صحرایی دیابتی باعث افزایش وزن بیضه شد.

اثر بر تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی: در موش‌های صحرایی گروه دیابتی تیمار با پودر کدو میانگین سلول‌های اسپرماتوگنی (میلی‌متر مربع) ۸۸/۸۰±۷/۳۱ و در گروه شاهد دیابتی (میلی‌متر مربع) ۷۷/۵۹ ±۳/۵٦ بود که در مقایسه با هم اختلاف معنی داری داشتند ($p<۰/۰۵$). میانگین به‌دست آمده از گروه دیابتی تیمار با پودر کدو در مقایسه با گروه‌های شاهد سالم و سالم تیمار با پودر کدو اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۲). پودر کدو در موش‌های صحرایی دیابتی باعث افزایش تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی شد.

اثر بر تعداد سلول‌های لایدیگ: در موش‌های صحرایی گروه دیابتی تیمار با پودر کدو میانگین تعداد سلول‌های لایدیگ (میلی‌متر مربع) ۷٦۸/۸±۱۷۲/٤ و در گروه شاهد دیابتی (میلی‌متر مربع) ۵۷۷/۹٤ ±۱۳۲/۹۹ بود که در مقایسه با هم اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<۰/۰۵$). میانگین به‌دست آمده از گروه دیابتی تیمار با پودر کدو در مقایسه با گروه‌های شاهد سالم و سالم تیمار با پودر کدو اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۲). پودر کدو در موش‌های صحرایی دیابتی باعث افزایش تعداد سلول‌های لایدیگ شد.

اثر بر تعداد سلول‌های سرتولی: در موش‌های صحرایی گروه دیابتی تیمار با پودر کدو میانگین تعداد سلول‌های سرتولی (میلی‌متر مربع) ۲۷/۷۸±۲/۸٤ و در گروه شاهد دیابتی ۲٦/۹۳±۱۰/۱۸ بود که در مقایسه با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند. میانگین به‌دست آمده از گروه دیابتی تیمار با پودر کدو در مقایسه با گروه‌های شاهد سالم و سالم تیمار با پودر کدو نیز اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۲). از طرف دیگر کاهش تعداد سلول‌های سرتولی در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه‌های شاهد سالم و سالم تیمار با پودر کد معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$).

جدول ۲- مقایسه میانگین پارامترهای بررسی شده در بافت بیضه جنین موش‌های دیابتی شده با آلوکسان بعد از تجویز پودر کدو

گروه‌ها	شاهد سالم	سالم تیمار با پودر کدو	شاهد دیابتی	دیابتی تیمار با پودر کدو
وزن بیضه (gr)	۰/٤۰ ± ٦/۰٦ ^{a}	۰/٤۳ ±۰/۳۳^{a}	۰/۲٦ ±۰/۰٦^{b}	۰/۳۸ ±۰/۰٤^{a}
تعداد اسپرماتوگونی (mm^2)	۹٤/۷ ±۱۳/۲٤ ^{a}	۹۰/٦۹ ± ۱۸/۱۵^{a}	۷۷/۵۹ ±۳/۵٦^{b}	۸۸/۸۰ ±۷/۳۱^{a}
تعداد لایدیگ (mm^2)	۸۱۵/۳۱ ±۱۵۱/٦۰^{a}	۸۰۲/۲۳ ± ۱٤۱/۵^{a}	۵۷۷/۹٤ ±۱۳۲/۹۹^{b}	۷٦۸/۸ ±۱۷۲/٤^{a}
تعداد سرتولی (mm^2)	۳۳/٤۰ ±۳/۹۹ ^{a}	۳۲/۱۵ ±۰/۹^{a}	۲٦/۹۳ ± ۱۰/۱۸ ^{b}	۲۷/۷۸ ±۲/۸٤^{ab}
قطر لوله منی‌ساز (mm^2)	۱۹۷/۲۲ ±۱۰/٦۳^{a}	۲۰۰/٤۷ ±۲۹/۳ ^{a}	۱۵۲/۱۹ ± ۱۰/۳٦^{c}	۱۸۰/۲۳ ±۱۱/۷۳^{b}

abc: حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میانگین بین گروه‌ها می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری دیابت مشکلات سیستم تولید مثلی مانند سقط جنین، ناهنجاری‌های ژنتیکی، عدم تکامل جنین و کاهش سلول‌های رده جنسی در اسپرماتوژنز را به دنبال دارد (Sweety *et al*., 2011). مطالعات آزمایشگاهی، آثار زیانبار دیابت را بر جنین ثابت کرده است (Pamfer *et al*., 1990). اگر چه نتایج برخی مطالعه‌ها نشانگر آن است که کنترل قند خون مادر و جلوگیری از افزایش آن در اوایل دوره حاملگی موجب کاهش بروز ناهنجاری‌های جنین می‌گردد، لیکن تجربه‌های بالینی عملاً نشان داده است که فراوانی ناهنجاری‌های مادرزادی در فرزندان مادران دیابتی به رغم کنترل هیپرگلسیمی همچنان به‌طور معنی‌داری بیش از جمعیت سالم است (Fuhrmann *et al*., 1983). لذا، امروزه توجه اغلب محققین به کاستن آثار ناهنجاری‌زای هیپرگلسیمی با استفاده از روش‌های دیگر متمرکز شده است. گزارش شده است که استرس‌های اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد نقش بسیار مهمی در ناهنجاری‌زایی دیابت ایفاء می‌کنند. زیرا در شرایط دیابت، از یک طرف تولید رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد و از طرف دیگر تولید آنتی‌اکسیدان‌ها کاهش پیدا می‌کند (Mills *et al*., 1998). این امر باعث افزایش صدمه ناشی از استرس‌های اکسیداتیو با تضعیف مکانیسم‌های حفاظتی مربوط به آنها می‌شود (Debora *et al*., 1996).

در مطالعه عسگری و همکاران در سال ۱۳۸۸، نتایج بافت‌شناسی کبد، حاکی از اثر پودر کدو بر کاهش اثرات سوء آلوکسان بر بافت کبد بود که متعاقب این عمل نشت آنزیم‌ها به درون سیتوزول نیز کاهش می‌یابد. بر طبق گزارش ایشان پودر کدو به طور موثری در کاهش آسیب کبدی ناشی از دیابت عمل می‌کند و لذا می‌توان این گیاه را به عنوان داروی ضد دیابتی در نظر گرفت (عسگری و همکاران، ۱۳۸۸). در تحقیق محامد و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داده شده است که پروتئین‌های دانه کدو باعث کاهش آسیب کبدی القاء شده توسط تتراکلرید کربن در موش‌های صحرایی می‌شود که کاهش میزان ALP، AST و ALT سرم مؤید این نظریه می‌باشد (Mohamed *et al*., 2006). در همین رابطه ال باتران و همکاران در سال ۲۰۰۶ عنوان کرده‌اند که مصرف عصاره کدوی تلخ موجب کاهش این آنزیم ها در موش‌های صحرایی دیابتی می‌گردد (El Batran *et al*., 2006).

در مطالعات وصال و همکاران در سال ۲۰۰۳، چنین بیان شده که در کدو ترکیبات آنتی‌اکسیدان گیاهی مانند ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی موجود می‌باشد. ترکیبات فلاوونوئیدی واجد فعالیت هیپوگلیسمی در موش‌های صحرایی دیابتی می‌باشند (Vessal *et al*., 2003). بایر دابوسکا در سال ۱۹۹۸، در مطالعه خود اشاره کرده که ترکیبات پلی‌فنلی و فلاوونوئیدها می‌توانند سلول را در برابر تخلیه گلوتاتیون احیاء و با افزایش ظرفیت آنزیم-های آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون، گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز محافظت کنند (Baer-Dubowska *et al*., 1998). سانگ و همکاران چنین بیان کرده‌اند که فلاوونوئید کوئرستین، جذب گلوکز را در روده مهار می‌کند، که این عمل به طور اختصاصی بر روی ناقل صورت می گیرد (Song *et al*., 2002).

در بررسی نتایج به‌دست آمده از هیستولوژی بافت بیضه در گروه دیابتی-کنترل، کاهش محسوسی در تعداد لوله‌های منی‌ساز در مقایسه با گروه دیابتی درمانی

داشت به‌طوری‌که افزایش فضاهای بینابینی در گروه دیابتی-کنترل به وضوح به چشم می‌خورد. سلول‌های زایا یا اسپرماتوگونی در گروه دیابتی-کنترل به‌طور پراکنده و با سیتوپلاسمی واکوئله که حاکی از روند دژنراسیون سلول است، دیده شد در حالی‌که در گروه دیابتی درمانی سلول‌های زایا با تعداد زیادتر و سیتوپلاسم عاری از واکوئل دیده شدند. چنین به‌نظر می‌رسد که پودر کدو با خاصیت آنتی‌اکسیدان خود از بروز روند دژنراسیون سلول‌های زایا جلوگیری می‌کند.

بر اساس نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، داروی آلوکسان باعث کاهش معنی‌دار قطر لوله‌های منی‌ساز در گروه دیابتی نسبت به گروه دیابتی درمان با پودر کدو شد. چنین به نظر می‌رسد که پودر کدو باعث افزایش قطر لوله‌های منی‌ساز در جنین‌های گروه دیابتی می‌شود. همچنین، داروی آلوکسان باعث کاهش معنی‌دار وزن بیضه در گروه دیابتی نسبت به گروه دیابتی درمان با پودر کدو شد در حالی‌که، گروه دیابتی درمان با پودر کدو اختلاف معنی‌داری با گروه‌های شاهد سالم و سالم تیمار با پودر کدو نداشت. چنین به‌نظر می‌رسد که پودر کدو باعث افزایش وزن بیضه جنین‌های گروه دیابتی می‌شود. از سوی دیگر، آلوکسان باعث کاهش معنی‌دار سلول‌های اسپرماتوگونی و لایدیگ در گروه دیابتی نسبت به گروه دیابتی درمان با پودر کدو، شاهد سالم و سالم تیمار با پودر کدو شد. به نظر می‌رسد که پودر کدو باعث افزایش سلول‌های اسپرماتوگونی و لایدیگ در جنین‌های گروه دیابتی می‌گردد. آلوکسان باعث کاهش معنی‌داری سلول‌های غیرجنسی سرتولی نسبت به گروه های شاهد و سالم تیمار با پودر کدو شد، در حالی‌که در مقایسه با گروه دیابتی درمان با پودر کدو اختلاف معنی‌داری نداشت.

مطالعات نشان داده است که رادیکال‌های آزاد اکسیژن نقش فعال در آسیب سلول‌های جنسی دارند. هیپرگلسیمی از یک طرف تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن را افزایش می‌دهد و از طرف دیگر باعث کاهش تولید آنتی‌اکسیدان‌ها در سلول‌ها می‌شود و با تضعیف مکانیسم‌های حفاظتی مربوط به آنها صدمه ناشی از استرس اکسیداتیو را افزایش می‌دهد (Lingjie *et al.*, 2001). هم‌چنین در مطالعه‌ای نشان داده شده است که در شرایط هیپرگلیسمی، در سلول‌های جنین غلظت آنتی‌اکسیدان‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (Ornoy *et al.*, 1999).

از نتایج این مطالعه چنین برمی‌آید که استفاده از پودر کدو به عنوان یک آنتی‌اکسیدان خوراکی می‌تواند تا اندازه‌ای موجب کاهش آثار تراتوژن هیپرگلسیمی در جنین‌های موش‌های صحرایی دیابتی گردد ولی کاملاً آن را نیز خنثی نمی‌کند. این موضوع نشان‌دهنده آن است که برخی از عوامل که در شرایط دیابتی به جنین آسیب می‌رسانند، احتمالاً ناشی از رادیکال‌های آزاد نباشند و بنابراین، با استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها نیز قابل جلوگیری نیستند.

بالیستر و همکاران در سال ۲۰۱٤ گزارش کرده‌اند که دیابت می‌تواند سبب اختلال در عمل اسپرماتوژنز با مکانیسم وابسته به FSH شده و تعداد اسپرم را کاهش دهد (Baliister *et al.*, 2014). افزایش قند خون مستقیماً با آسیب میتوکندری‌ها و شبکه آندوپلاسمی صاف بر سلول‌های لایدیگ و سرتولی موش‌های صحرائی دیابتی اثر سوء خود را نشان می‌دهد

(Borland *et al*., 1984). کاهش سلول‌های لایدیگ و سرتولی و تغییرات بافتی لوله‌های منی‌ساز بیضه جنین موش‌های صحرائی از مادران دیابتی نشان‌دهنده این است که دیابت روند اسپرماتوژنز بیضه را کاهش دهد. بنابراین، می‌شود نتیجه گرفت که احتمالاً دیابت با تأثیر بر روند تکثیر سلول‌های سرتولی در لوله‌های منی‌ساز طی دوره جنینی موجب کاهش فعالیت اسپرماتوژنیک در این لوله‌ها و در نهایت کاهش در قطر لوله‌های منی‌ساز و ارتفاع اپی‌تلیوم زایا و در نتیجه کاهش وزن و حجم بیضه جنین می‌شود. نتایج سایر مطالعات نیز با نتایج این مطالعه مطابقت دارد (Akashi *et al*., 1999).

نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز پودر کدو به مبتلایان دیابتی در دوره حاملگی از وقوع کاهش رشد جنین و کاهش پارامترهای کمی وکیفی ساختار بیضه نقش محافظتی معنی‌داری دارد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، پیشنهاد می‌شود که اثرات محافظتی پودر کدو در دوره شیرواری روی نوزادانی که از مادران دیابتی تغذیه می‌کنند، بررسی گردد.

سپاسگزاری

این مقاله از طرح تحقیقاتی که با بودجه پژوهشی و حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به انجام رسیده است، استخراج شده است. بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- عسگری، ص.، کاظمی، س.، سیدجمال مشتاقیان، س.ج.، رفیعیان، م.، بهرامی، م. و عادل‌نیا، ا. (۱۳۸۸). اثر حفاظتی پودر کدو بر آسیب کبدی موش‌های صحرائی دیابتی شده با آلوکسان. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، دوره٤٤، شماره٤، صفحات: ٦٥-٥٩.
- Akashi, M., Akazawa, M. and Akazawa, S. (1999). Effect of insulin and myo-inositolon embryo Growth and development during early organogenesis in streptozotocin- induced diabetic rats. Diabetes, 40: 1574-1579.
- Asgary, S., Parkhideh, S., Solhpour, A., Madani, H., Mahzouni, P. and Rahimi, P. (2008). Effect of ethanolic extract of Juglans regia L. on blood sugar in diabetes-induced Rats. Journal of Medicinal Food, 11(3): 533-538.
- Bombardelli, E. and Morazzoni, P. (1997). Curcubita pepo L. Fitoterapia, 68(4): 291-302.
- Baer-Dubowska, W., Szaefer, H. and Krajka-Kuzniak, V. (1998). Inhibition of murin hepatic cytochrom P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds. Xenobiotica, 28: 735-743.
- Baliister, J., Munoz, Mc., Dominguez, J., Rigau, T., Guinovat, J. and Rodriguez-Gill, J. (2004). Insulin-dependent diabetes affects testicular functions by FSII and LH-linked mechanisms. Journal of Andrology, 25: 706-719.
- Borland, K. and Mita, M. (1984). The actions of insulin- like growth factor I and II on cultured sertoli cells. Endocrinology, 114: 240-246.

- Donnini, D. and Zambito, A.M. (1996). Glucose May Induces Cell Death Through a Free Radical – mediated Mechanism. Biochemical and Biophysical Research Communications, 219: 412-417.
- Dey, L., Attele, A.S. and Yuan, C.S. (2002). Alternative therapies for type 2 diabetes. Alternative Medicine Review, 7(1): 45-58.
- El Batran, S.A., El-Gengaihi, S.E. and El-Shabrawy, O.A. (2006). Some toxicological studies of Momordica charanita L. on albino rats in normal and alloxan diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology, 108(2): 236-242.
- Fuhrmann, K. Reihe,r H. and Semmler, K. (1983). Prevention of Congenital Malformations in Infants of Insulin dependent Diabetic Mothers. Diabetes Care, 219-223.
- Ghasemi-dehkordi, N. (2002). Iranian herbal pharmacopoeia. Tehran: Ministry of Health and Medical Education, pp: 615.
- Jelodar, G., Khaksar, Z. and Pourahmadi M. (2010). Endocrine profile and testicular histomorphometry in neonatal rats of diabetic mothers. Veterinarski Arhiv, 80(3): 421-430.
- Hassen, N.S., EI-Roubi, N.M. and Omara E.A. (2007). Evaluation of the inflfl uence of each of melatonin and chromium against diabetes-induced alteration in the testis of Albino rats using light and electron microscopies. Egyptian Journal of Hospital Medicine, 27: 143-162.
- Lazos, E.S. (1986). Nutritional, Fatty acids and oil characteristics of pumpkin and melon seeds. Journal of Food Science, 51(5): 1382-1383.
- Zhao, L. (2001). Effects of Free Radicals in Diabetes. Free Radical Biology and Medicine, 77: 222-244.
- Marles, R. and Farnsworth, N.R. (1995). Antidiabetic plants and their active constituents. Phytomedicine, 2(2): 137-146.
- Mills, J.L. Knopp, R.H. and Simpson, J.L. (1998). Peterson L Lack of Relation of Increased Malformation Rates in Infants of Diabetic Mother to Glycemic control During Organogenesis. The New England Journal of Medicine, 318-671.
- Mohamed, R.A. Ramadan, R.S. and Ahmed, L.A. (2009). Effect of substituting pumpkin seed protein isolate for casein on serum liver enzymes, lipid profile and antioxidant enzymes in CCl4-intoxicated rats. Advances in Biological Research, 3: 9-15.
- Ornoy, A., Zakenm, V. and Kohen, R. (1999). Role of ROS in the diabetes induced anomalies in rat embryos in vitro. Teratology, 60(6):376-386.
- Pamfer, P., Hertogh, R. and Vanderhyden, I. (2005). Decreased Inner call mass proportion in Blastocyst from Diabetic Rats. Diabetes, 39: 471-476.
- Quanhong, L., Caili, F., Yukui, R., Guanghui, H. and Tongyi, C. (2005). Effects of protein-bound polysaccharide isolated from pumpkin on insulin in diabetic rats. Plant Foods for Human Nutrition, 60: 13-16.
- Song, J., Kwon, O., Chen, S., Daruwala, R., Eck, P., Park, J.B., *et al*. (2002). Flavonoid inhibition of sodium-dependent vitamin c transporter 1 (SVCT1) and glucose transporter isoform 2 (glut2), intestinal transporters for vitamin c and glucose. Journal of Biological Chemistry, 277(18): 15252-15260.
- Sweety, L., Debapriya, G. and Dheeraj, A. (2011). Antihyperglycemic potential of Aloe vera gel in experimental animal model. Annals of Biological Research, 2(1): 17-31.
- Ugbenyen, A.M. and Odetola, A.A. (2009). Hypoglycemic potential of young leave methanolic extract of Magnifera indica in alloxan induced diabetic rat. Pakistan Journal of Nutrition, 8(3): 239-241.
- Van Assche, F., Aerts, L. and De Prins, F.A. (1983). Degranulation of the insulin producing B cells in an infant of a diabetic mother. Case report, British Journal of Obstetrics and Gynecology, 90: 182-185.
- Vessal, M., Hemmati, M. and Vasei, M. (2003). Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. Comparative Biochemistry and Physiology, 135: 357-364.

Protective effect of pumpkin powder (*Cucurbita pepo* L.) on fetal testicular tissue damage in alloxan- induced diabetic rats

Hejazi, S.[1*], Afshari, F.[2]

1-Assistant Professor, Department of Anatomy, College of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2-Assistant Professor, Department of Basic Sciences, College of Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
*Corresponding author email: sajjad.hejazi@iaut.ac.ir
(Received: 2014/8/18 Accepted: 2014/10/20)

Abstract

The occurrence of abnormalities in different organs of the fetus and newborn of diabetic mothers has been proven today. Considering the irreversible damages of the disease in newborns' reproductive system any action to reduce the abnormalities has an especial importance and necessity. In this experimental study, the protective effects of pumpkin powder on reducing testicular tissue damages of rats born from diabetic mothers has been studied. The pregnant rats were divided into 4 groups of 10 rats, as follows: 1) treatment group with pumpkin powder, 2) diabetic control group, 3) treatment group (diabetic animals treated with pumpkin powder) and 4) healthy control group. Experimental diabetes was induced in pregnant rats by intraperitoneal injection of 120 mg/kg b.w. alloxan monohydrate. The first and third groups received 2 g/kg b.w. pumpkin powder for 4 weeks via gavage. The histological and morphometric changes such as weight, seminiferous tubules diameter, spermatogonia, leydig and sertoli cell numbers were compared. Data was analyzed using the ANOVA and Tukey multiple comparisons test and $p<0.05$ was considered significant. Testicular. Testicular tissue histology of diabetic control group showed a marked decline in the numbers of seminiferous tubules compared with the healthy control and diabetic treatment group. In diabetic control group, scattered germ cells or spermatogonia was observed with a vacuolated cytoplasm suggesting cell degeneration, while in diabetic treatment group more germ cells without vacuolated cytoplasm were observed. There was a significant reduction of testicular weight in the diabetic control group compared with the diabetic treatment group. In diabetic control group, the diameter of germ cells, leydig and sertoli cells as well as the seminiferous tubules diameter had a significant reduction compared with the control group. In diabetic control group, pumpkin powder administration had increased the diameter of germ cells, leydig and sertoli cells as well as the seminiferous tubules compared with the diabetic treatment group. The results demonstrated that pumpkin powder had a protective effect against testicular tissue damage in fetuses born from alloxan induced diabetic mothers.

Key words: Diabetes, Alloxan, Testis, *Cucurbita pepo* L., Rat.