

Protective Effect of Hydroalcoholic Extract of *Melissa Officinalis* L. on Ethanol-Induced Testicular Toxicity in Wistar Rats

Emran Habibi^{1,2},
Maloos Naderi³,
Fereshteh Talebpour Amiri⁴,
Fatemeh Emamgholizadeh⁵,
Fatemeh Shaki^{6,7}

¹ Assistant Professor, Traditional and Complementary Medicine Research Center, Addiction Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Assistant Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ PhD Candidate of Toxicology, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Anatomy, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Pharmacy Student, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ Associate Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁷ Associate Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received June 13, 2021 ; Accepted October 12, 2021)

Abstract

Background and purpose: *Melissa officinalis* (MO) is a medicinal plant and is a rich source of antioxidant and phenolic compounds. The aim of this study was to evaluate the protective effect of *Melissa officinalis* against ethanol induced sub-chronic testicular toxicity in male Wistar rats.

Materials and methods: Ethanol extract of MO was prepared and total phenolic and flavonoid contents were determined. The Animals were divided into seven groups: control (treated with normal saline), ethanol (10 mg/kg,ip), ethanol and MO extract (100, 200, and 400 mg/kg), MO extract alone (400 mg/kg), and ethanol+ Vit C (positive control). After 56 days, the rats were sacrificed and testis and epididymis were harvested. Oxidative stress markers including: level of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), protein carbonyl (PC), and glutathione (GSH), and also nitric oxide (NO) as an inflammatory factor were assayed in testis tissue. Moreover, sperm parameters analysis and histopathological evaluation of testis tissue were performed.

Results: Ethanol increased reactive oxygen species, lipid peroxidation, carbonyl protein, and nitric oxide and decreased glutathione in testicular tissue. Pathological lesions, decrease in motility, count and normal morphology of sperm were also observed in ethanol-treated groups. *Melissa officinalis* inhibited ethanol-induced oxidative stress in testicular tissue and improved sperm abnormalities and pathological lesions.

Conclusion: *Melissa officinalis* showed protective effect against ethanol-induced testicular toxicity which may be attributed to its antioxidant activity. So, it can be considered as an effective supplement against oxidative stress induced by chronic ethanol exposure in testis tissue.

Keywords: *Melissa officinalis*, oxidative stress, alcohol, testicular toxicity, sperm parameters

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (202): 13-24 (Persian).

* Corresponding Author: Fatemeh Shaki - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
(E-mail: fshaki.tox@gmail.com)

اثر حفاظتی عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه بر سمیت بیضه ناشی از اتانول در موش‌های صحرایی نر

عمران حبیبی^{2,1}
ملوس نادری³
فرشته طالب پور امیری⁴
فاطمه امامقلی زاده⁵
فاطمه شکر^{7,6}

چکیده

سابقه و هدف: بادرنجبویه یک گیاه دارویی غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی و فنولی است. هدف این مطالعه بررسی اثرات محافظتی عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه در برابر سمیت بیضه ناشی از مواجهه مزمن با اتانول در موش‌های صحرایی نر بود.

مواد و روش‌ها: عصاره هیدروالکلی از گیاه بادرنجبویه تهیه و محتوای تام فنولی و فلاونوئیدی آن تعیین شد. موش‌های صحرایی به 7 گروه شامل کنترل، گروه اتانول (10 میلی گرم بر کیلوگرم)، گروه اتانول به همراه دوزهای مختلف از عصاره (100، 200، 400 میلی گرم بر کیلوگرم) و گروه عصاره با دوز 400 میلی گرم بر کیلوگرم و کنترل مثبت (ویتامین ث) تقسیم شدند. بعد از 56 روز درمان، بیضه‌ها و اپیدیدیم جدا و فاکتورهای استرس اکسیداتیو (شامل ذرات فعال اکسیژن، لیپید پراکسیداسیون، پروتئین کربونیل و گلووتاتیون) و فاکتور التهابی نیتریک اکسید اندازه‌گیری شد. همچنین آنالیز پارامترهای اسیرم و ارزیابی پاتولوژی در یافت بیضه انجام شد.

یافته‌ها: اتانول سبب افزایش ذرات فعال اکسیژن، لیپید پراکسیداسیون، پروتئین کربونیل، نیتریک اکسید و کاهش گلو تاتیون در بافت بیضه شد. همچنین ضایعات پاتولوژی، کاهش در تحرک، تعداد و مرفولوژی نرمال اسپرم در گروه‌های تحت درمان با اتانول مشاهده شد. تجویز بادرنجویه استرس اکسیداتیو ناشی از اتانول را در بافت بیضه مهار کرد و سبب بهبود در ناهنجاری‌های اسپرم و ضایعات پاتولوژیک شد.

استنتاج: بادرنجبویه اثرات محافظتی در برابر سمیت بیضه ناشی از اتانول را نشان داد که احتمالاً به واسطه فعالیت آنتی اکسیدانی آن است. بنابراین، می توان آن را به عنوان یک مکمل مؤثر در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از مواجهه مزمن اتانول در یافت بوضه در نظر گرفت.

واژه های کلیدی: مادرانچوبه، استرس اکسیداتیو، الکال، سمیت مضه، پارامترهای اسپرم

مقدمه

ناباروری یکی از اصلی ترین مشکلات سلامتی در زندگی انسان است و تقریباً 30 درصد این مشکل مربوط به اختلال عملکرد در سیستم تولیدمثل مردان است. اسپرماتوژنز یک فرآیند حساس و پیچیده است و عوامل

E-Mail: fshaki.tox@gmail.com

مؤلف مسئول: فاطمه شنکی - ساری: کلو متر 17 جاده دریا، مجتمع دانشگاهی، بامبر اعظم، دانشکده داروسازی

1. استادیار، مرکز تحقیقات طب سنتی و مکمل، پژوهشکده اعتدال، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 2. استادیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 3. دانشجوی دکتری تخصصی سم شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.
 4. دانشیار، گروه آناتومی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.
 5. دانشجوی دکتری عمومی داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.
 6. دانشیار، گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 7. دانشیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، مؤسسه هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
- تاریخ دریافت: 1400/3/23 تاریخ رجوع جهت اصلاحات: 1400/3/29 تاریخ تصویب: 1400/7/20

مختلفی می توانند این روند را مختل کنند و منجر به کاهش تعداد و کیفیت اسپرم و متعاقب آن کاهش باروری مردان شوند. یکی از رایج ترین دلایل ناباروری مردان استفاده طولانی مدت از برخی داروهاست (1). مطالعات زیادی نشان داده است که 42 درصد از موارد ناباروری مردان با مصرف الکل در ارتباط است. اتانول پرمصرف ترین ماده دارویی مورد سوءاستفاده در جهان است (2،3). مطالعات نشان داد که مصرف مزمن و مداوم الکل اثرات سمی بر سیستم تولیدمثل مردان ایجاد می کند و با کاهش تستوسترون، آتروفی بیضه و اختلال در عملکرد جنسی همراه است. الکل به عنوان یک سم بالقوه بیضه شناخته شده و باعث کاهش در غلظت اسپرم تحرک اسپرم و اختلالات مورفولوژیک آن می شود (4). طبق گزارش های مختلف، استرس اکسیداتیو و سمیت ناشی از رادیکال های آزاد به عنوان اولین و مهم ترین مکانیسم سمیت اتانول در بافت بیضه نقش دارد (5). استرس اکسیداتیو عدم تعادل بین تولید رادیکال آزاد و توانایی سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در حذف این عوامل است (6). مطالعات مختلف نشان می دهد که رادیکال آزاد در تغییرات بیضه و اختلالات تولیدمثلی ناشی از اتانول نقش دارد (7،8). در مطالعات دیگری بیان شد که ذرات فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدها می توانند به عنوان مهم ترین مکانیسم در سمیت تولیدمثلی ناشی از اتانول نقش داشته باشد (9-11).

گیاه بادرنجبویه (*Mellisa officinalis* L) متعلق به خانواده نعنائیان است. در طب سنتی خصوصاً در ترکیه و ایران برای درمان برخی از بیماری ها مورد استفاده قرار گرفته است. ترکیبات فنولی موجود در این گیاه خاصیت آنتی اکسیدانی دارد. در مطالعات مختلفی فعالیت های آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد ویروسی، ضد قارچی، ضد انگلی، ضد دیابتی، ضد اسپاسمی، درمان در اختلالات خواب و آرام بخشی از آن گزارش شده است (12-15). اثرات آنتی اکسیدانی رزمارینک اسید و بنزودیوکسول موجود در عصاره این گیاه حتی تا ده

برابر قوی تر از اثرات آنتی اکسیدانی ویتامین های B و C است. برگ گیاه حاوی 0/1 تا 0/25 درصد اسانس (روغن فرار) است و ترکیبات موجود در آن دارای اثرات آنتی اکسیدان قابل ملاحظه ای هستند (16). هدف از این مطالعه بررسی اثر محافظتی عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه در مقابل سمیت تولیدمثلی ناشی از مواجهه مزمن با اتانول در موش های صحرایی نر با رویکرد به خاصیت آنتی اکسیدانی این گیاه بوده است.

مواد و روش ها

جمع آوری و عصاره گیری گیاه

اندام های هوایی (ساقه و برگ) گیاه بادرنجبویه از شهرستان نکا (استان مازندران) در فصل بهار جمع آوری شد و توسط کارشناس مربوط، جنس و گونه علمی گیاه شناسایی شد و نام علمی گیاه توسط متخصص مربوط، مورد تایید قرار گرفت و با شماره هرباریومی E1-36-41631 در هرباریوم دانشکده داروسازی ساری نگهداری می شود. بعد از خشک کردن گیاه، عصاره گیری با اتانول 70 درصد و به روش خیساندن انجام شد. عصاره تهیه شده توسط دستگاه روتاری تحت شرایط خلا تغلیظ شد و در نهایت با کمک دستگاه فریزدرایر به صورت پودر خشک تهیه شد و تا روز استفاده در ظرف درب بسته درون یخچال نگهداری شد. محتوای تام فنول عصاره تهیه شده گیاه بادرنجبویه بر اساس میلی گرم گالیک اسید به ازای هر گرم از عصاره خشک گیاه به روش اسپکتروفوتومتری (طول موج 765 نانومتر) و همراه با معرف فولین سیو کالتیو تعیین شد (17). همچنین محتوای تام فلاونوئید با کمک روش اسپکتروفوتومتری و معرف آلومینیوم کلراید تعیین شد. محتوای فلاونوئیدی بر اساس میلی گرم کوئرستین به ازای هر گرم عصاره خشک گیاه بیان شد. ارزیابی فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه توسط رادیکال 1 و 1-دی فنیل 2 پیکریل هیدرازین (DPPH) به روش اسپکتروفوتومتری انجام شد. در این روش از ویتامین ث

و نیز بوتیل هیدروکسی آنیزول به عنوان استاندارد استفاده شد. در نهایت غلظتی از نمونه‌ها که برای جاروب کردن 50 درصد رادیکال‌های DPPH مورد نیاز بود به عنوان IC50 گزارش شد (18).

طراحی مطالعه

موش‌های صحرایی نر با محدوده وزنی 200 تا 250 گرم در شرایط استاندارد دمایی و محیطی با دسترسی مناسب به آب و غذا و رعایت سیکل 12 ساعته روشنایی و تاریکی نگهداری شدند. تمام مراحل آزمایش‌ها با توجه به دستورالعمل‌های ثبت شده در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شد. حیوانات به طور تصادفی به 7 گروه شش تایی به شرح زیر تقسیم بندی شدند: گروه اول (کنترل) نرمال سالین و گروه دوم اتانول با دوز 10 میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه‌های سوم تا پنجم علاوه بر اتانول داخل صفاقی، عصاره با دوزهای 100، 200، 400 میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. یک گروه فقط عصاره با دوز 400 میلی گرم بر کیلوگرم به صورت صفاقی دریافت کرد. یک گروه نیز به عنوان کنترل مثبت ویتامین ث با دوز 500 میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کرد. این پروتکل به مدت 56 روز متوالی ادامه یافت (2 روز در هفته Drug-free بودند) و پس از آن حیوانات بیهوش و بافت بیضه آن‌ها جدا شد. بعد از هموژناسیون بافت‌ها، فاکتورهای استرس اکسیداتیو (پروتئین کربونیل، مالون دی آلدئید، گلو تاتیون و ذرات فعال اکسیژن)، فاکتور التهابی (نیتریک اکسید) و پارامترهای آسیب به اسپرم (حرکت، تعداد، تغییرات مورفولوژیکی) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین بررسی پاتولوژیک بافت بیضه نیز جهت ارزیابی میزان آسیب بافتی انجام شد.

اندازه گیری غلظت پروتئین

محتوی پروتئین در بافت بیضه با روش برادفورد اندازه گیری شد. از آلبومین سرم گاو به عنوان استاندارد استفاده شد. نمونه‌های هموژن شده با کوماسی

بلو ترکیب شد و پس از گذشت 10 دقیقه جذب آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج 595 نانومتر اندازه گیری شد و سپس میزان پروتئین‌های نمونه به میزان 1 میلی گرم پروتئین در هر میلی لیتر برای سایر آزمایشات تنظیم شد (19).

ارزیابی پارامترهای استرس اکسیداتیو

اندازه گیری میزان ذرات فعال اکسیژن (ROS) با فلوریمتری اندازه گیری سطوح ذرات فعال اکسیژن با استفاده از معرف دی کلرو فلورسئین دی استات (DCFH-DA) انجام شد. به طور خلاصه معرف مذکور با غلظت 10 μM به نمونه‌ها افزوده و به مدت 10 دقیقه انکوبه شد. میزان رادیکال‌های آزاد با کمک دستگاه فلوریمتر Shimadzu RF5000U در طول موج تحریکی 485 نانومتر و طول موج نشری 520 نانومتر اندازه گیری شد (20).

اندازه گیری میزان لیپید پراکسیداسیون

اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید (MDA) به عنوان مارکر لیپید پراکسیداسیون توسط روش تیوباریتوریک اسید انجام شد. بدین ترتیب که به 0/2 میلی لیتر از سوسپانسیون متوکندریایی یا بافتی 0/1 میلی لیتر از معرف TBA (شامل 0/5 HCl مولار و 15 TCA درصد و TBA 0/3 درصد) اضافه نموده و به خوبی مخلوط می نماییم و محلول حاصل را در حمام آب گرم 100 درجه سانتی گراد به مدت زمان 30 دقیقه انکوبه می نماییم و پس از سرد شدن به آن 0/4 میلی لیتر n-بوتانول افزوده و خوب تکان می دهیم. سپس محلول با سانتریفیوژ با دور 3500 دور بر ثانیه به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ می کنیم. لایه n-بوتانول را جدا کرده و جذب آن در طول موج 532 نانومتر توسط دستگاه الایزا (Tecan, Rainbow Thermo, and Austria) اندازه گیری شد (21).

اندازه گیری پروتئین کربونیل

از معرف 2,4-dinitrophenyl-hydrazine (DNPH) جهت اندازه گیری میزان پروتئین کربونیل استفاده می گردد. پس از تعیین میزان پروتئین بافت 500 میکرولیتر از

تری کلرو استیک اسید 20 درصد (w/v) به 250 میکروگرم از نمونه اضافه می نمایم و در دمای 4 درجه سانتی گراد به مدت 15 دقیقه قرار داده می شود. سپس پروتئین های رسوب داده شده را با سانتریفیوژ با 6500 دور بر ثانیه در زمان 10 دقیقه سانتریفیوژ نموده و محلولی رویی را دور ریخته و رسوب زیرین مورد استفاده قرار می گیرد. رسوب را در 500 میکرولیتر از محلول 0/1 NaOH مولار پراکنده نموده و در 500 میکرو لیتر از محلول 10 میلی مولار DNPH حل شده در HCl (2 مولار) به نمونه ها می افزاییم. همچنین از یک بلانک با اضافه نمودن 500 میکرولیتر از HCl (2 مولار) بدون DNPH از نمونه پروتئین تهیه می نمایم سپس به مدت 30 دقیقه نمونه ها را در دمای اتاق و به دور از نور انکوبه می نمایم و 500 میکرولیتر از تری کلرواستیک اسید 20 درصد (w/v) به نمونه ها می افزاییم. رسوب پروتئینی با سانتریفیوژ با 6500 دور بر ثانیه در زمان 10 دقیقه سانتریفیوژ نموده و محلول رویی را دور ریخته و رسوب زیرین با 1 میلی لیتر از مخلوط اتانول و اتیل استات به صورت 1 به 1 ترکیب می کنیم و مجدداً با سانتریفیوژ با 6500 دور بر ثانیه و مدت زمان 10 دقیقه سانتریفیوژ کرده و محلول رویی را دور ریخته و رسوب نهایی با 20 میکرولیتر از محلول گوانین هیدروکلراید 6 مولار پراکنده نموده و میزان جذب نمونه ها را در طول موج 365 نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتری قرائت گردید (22).

اندازه گیری محتوای گلو تاتیون

محتوای گلو تاتیون به کمک معرف دی تیونیترو بنزوتیک اسید اندازه گیری شد. شدت رنگ تولید شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری در طول موج 412 نانومتر ارزیابی و میزان گلو تاتیون بر حسب نانومولار گزارش شد (23).

اندازه گیری فاکتورهای التهابی

نیتریک اکساید (NO)

محتوای نیتریک اکساید بر اساس معرف گریس

سنجیده شد. در این روش سولفانلیک اسید توسط واکنش با نیتريت در محلول اسید به نمک دیازینیوم تبدیل شد. نمک دیازینیوم سپس به N-(1 نفتیل) اتیلن دیامین که فرمی از آزو است تبدیل شد و به روش طیف سنج کمی در 548 نانومتر جذب آن اندازه گیری شد (24).

ارزیابی پارامترهای اسپرم

تعیین تعداد اسپرم

بعد از جداسازی اپیدیدیم و با خرد کردن اپیدیدیم با قیچی نمونه های مایع منی از اپیدیدیم خارج شد و بعد از 10 دقیقه انکوباسیون در دمای 32 درجه سانتی گراد، تعداد اسپرم توسط هموسیتر و میکروسکوپ با بزرگنمایی 40 به عنوان یک میلیون در یک میلی لیتر از اندازه نمونه بیان شد (25).

2-6-2. تعیین تحرک اسپرم

سنجش حرکت اسپرم براساس دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت (WHO) انجام شد. به این ترتیب که قبل از برداشتن نمونه آن را کاملاً هموژن و میکس کرده، سپس 10 میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم در محیط کشت روی لام قرار داده شد و روی آن لامل قرار گرفت. بلافاصله نمونه را با بزرگنمایی 40 میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این تست، حداقل 5 میدان میکروسکوپی و حداقل 200 اسپرم را برای هر حیوان مورد بررسی قرار گرفت و درصد اسپرم های متحرک محاسبه شد. شمارش برای هر نمونه 2 بار انجام گرفت و میانگین آن اعلام شد. سپس درصد اسپرم های متحرک نسبت به تعداد کل اسپرم های شمارش شده در هر تکرار محاسبه و در نهایت میانگین اسپرم های متحرک در هر حیوان تعیین شد (25).

تعیین مورفولوژی اسپرم

اسمیر اسپرم بر روی لام تهیه شد. لام ها با 1% nigrosin/Eosin-Y رنگ آمیزی شدند و اجازه داده شد در هوای آزاد خشک شود. سپس ناهنجاری های

مورفولوژیکی مانند اسپرم‌های دارای سر کوچک، بدون سر، سر دوکی، گردن خمیده، دو سر، دو دم، دم خمیده، دم پیچ خورده یا غیرطبیعی، دم کوتاه و بدون دم در حداقل 200 اسپرم در هر حیوان با بزرگنمایی 100 با میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت (25).

بررسی هیستوپاتولوژیک بافت بیضه

نمونه‌های بافت بیضه در برش‌هایی با 5 میکرون ضخامت توسط رنگ‌های همتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند. سپس لام‌های هیستولوژی توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز آماری

نتایج برحسب میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده و همه آنالیزهای آماری توسط نرم‌افزار آماری SPSS مدل 14 انجام شد. از تست‌های آماری آنوای یک‌طرفه با پست تست Tukey استفاده شد. معنی‌داری از $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

محتوای تام فنول و فلاونوئید و میزان فعالیت جاروب کنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره هیدروالکلی بادرنبویه

محتوای تام فنلی عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنبویه $56/4 \pm 0/9$ میلی گرم معادل گالیک اسید در یک گرم عصاره خشک گیاه و محتوای تام فلاونوئیدی عصاره $14/7 \pm 6/5$ میلی گرم معادل کوئرستین در یک گرم عصاره خشک برگ و گل گیاه تعیین شد. همچنین نتایج IC50 عصاره‌ها جهت ارزیابی خاصیت جاروب کنندگی رادیکال DPPH تعیین شد.

اثر عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنبویه بر تشکیل ذرات فعال اکسیژن در بیضه موش صحرایی

همان‌طور که در جدول شماره 1 مشاهده می‌شود مواجهه با اتانول به شکل معنی‌داری با افزایش سطح ذرات

فعال اکسیژن همراه بود و تجویز عصاره بادرنبویه میزان تولید ذرات فعال اکسیژن را در مقایسه با گروه دریافت‌کننده اتانول به‌طور چشمگیری مهار کرد ($P < 0/05$).

اثر عصاره گیاه بادرنبویه بر پراکسید/سیون لیپیدی در بیضه موش صحرایی

همان‌طور که در جدول شماره 1 مشاهده می‌شود میزان MDA در بافت بیضه رت‌های تحت مواجهه با اتانول به‌طور معنی‌داری افزایش داشت. نتایج نشان داد که در گروه دریافت‌کننده عصاره بادرنبویه نسبت به گروه دریافت‌کننده اتانول میزان تولید MDA به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0/05$).

اثر عصاره گیاه بادرنبویه بر پروتئین کربونیل در بیضه موش صحرایی

در مطالعه حاضر نشان داده شد که مواجهه با اتانول با افزایش معنی‌دار سطح پروتئین کربونیل در بیضه رت همراه بود (جدول شماره 1). نتایج نشان داد که در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره بادرنبویه نسبت به گروه دریافت‌کننده اتانول کاهش این بیومارکر مشاهده شد ($P < 0/05$).

اثر عصاره گیاه بادرنبویه بر غلظت گلو تاتیون در بیضه موش صحرایی

در مطالعه حاضر نشان داده شد که اتانول سبب تخلیه سطوح گلو تاتیون در بافت بیضه شده است (جدول شماره 1). از سویی دیگر تجویز عصاره بادرنبویه توانست به‌طور معنی‌داری از کاهش سطح گلو تاتیون در این بافت ممانعت کند ($P < 0/05$).

اثر عصاره گیاه بادرنبویه بر میزان نیتریک اکساید در بافت بیضه

همان‌طور که در جدول شماره 1 مشاهده می‌شود میزان NO در گروه دریافت‌کننده اتانول بسیار افزایش یافته است و از سویی دیگر در گروه‌های تحت درمان با عصاره بادرنبویه نسبت به گروه دریافت‌کننده اتانول کاهش این بیومارکر مشاهده شد ($P < 0/05$).

جدول شماره 1: تأثیر عصاره گیاه بادرنجبویه بر پارامترهای استرس اکسیداتیو و التهابی

گروه	ذرات فعال اکسیژن (Fluorescence Intensity)	لیپید پراکسیداسیون (μM)	گلوتاتیون (μM)	پروتئین کربونیل (μM)	نیتریک اکسید (μM)
کنترل	35/7±3/74	2/84±1/07	100±6/37	0/585±0/17	14/2±4/04
عصاره (400mg/kg)	27/4±3/66	3/93±1/32	113±5/89	0/646±0/17	14±3/91
اتانول	93/7±6/35***	13/7±1/55***	48/1±5/73***	1/21±0/11***	69/2±7/01***
اتانول+عصاره (100mg/kg)	82/1±7/24#	9/89±1/42##	52±4/05	1/11±0/09	49/5±8/32##
اتانول+عصاره (200mg/kg)	81/2±8/14##	5/58±2/04###	60/1±4/10#	0/887±0/06#	26/4±4/78###
اتانول+عصاره (400mg/kg)	51/6±1/78###	5/40±0/68###	107±6/72###	0/740±0/19###	22/3±2/38###
اتانول+ویتامین ث (500mg/kg)	77/5±3/49###	7/64±0/96###	60/1±6/77#	0/829±0/17##	31/7±3/06###

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. ##: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه اتانول است ($P < 0/01$).

***: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل است ($P < 0/001$). ###: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه اتانول است ($P < 0/001$).

#: نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه اتانول است ($P < 0/05$). ویتامین ث (Vit C): به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

اتانول دریافت کردند کاهش در ضخامت اپیتلیوم، افزایش لومن لوله سمی نیفر، کاهش اسپرما توزوئید در داخل فضای لومن و ادم بین لوله ها را نشان دادند. تصویر شماره 1-C و تصویر شماره 1-D نشان می دهد تجویز بادرنجبویه در موش هایی که اتانول دریافت کردند توانست این آسیب در ساختار بافتی بیضه را بهبود ببخشد. همان گونه که تصویر نشان می دهد این بهبودی در دوز 400 میلی گرم/کیلو گرم کاملاً مشهود می باشد.

تأثیر عصاره بادرنجبویه بر تعداد حرکت و مورفولوژی اسپرم همان طور که در جدول شماره 2 مشاهده می شود کاهش در تحرک، تعداد و مورفولوژی نرمال اسپرم در گروه های تحت درمان با اتانول مشاهده شد و از سویی دیگر تجویز عصاره بادرنجبویه نسبت به گروه دریافت کننده اتانول توانست سبب بهبود در ناهنجاری های اسپرم شود ($P < 0/05$).

جدول شماره 2: اثر گیاه بادرنجبویه بر روی تعداد، حرکت و مورفولوژی اسپرم ها در رت های نر دریافت کننده اتانول

گروه	تعداد اسپرم ($\times 10^9$)	حرکت اسپرم (درصد)	مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم (درصد)
کنترل	232±2/32	67/5±9/81	9±2/83
عصاره (400mg/kg)	258±3/54	64/7±12/3	9/33±4/37
اتانول	14±2/83***	40/7±7/23***	23/8±5/27***
اتانول+عصاره (100mg/kg)	165±2/17	37/3±11/7	19±2/61
اتانول+عصاره (200mg/kg)	185±1/87	56/1±5/14	18/2±2/99
اتانول+عصاره (400mg/kg)	22/5±3/08###	61/3±5/09##	13/8±2/32###
اتانول+ویتامین ث (500mg/kg)	207±2/73###	44/3±6/62	17/7±2/80

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.

***: اختلاف معنادار با گروه کنترل ($P < 0/001$).

##: اختلاف معنی دار با گروه دریافت کننده اتانول ($P < 0/01$).

###: اختلاف معنی دار با گروه دریافت کننده اتانول ($P < 0/001$).

نتایج حاصل از مطالعات هیستوپاتولوژی بیضه

تصویر شماره 1: فتومیکروگراف هایی از بافت بیضه در همه گروه ها. (A) کنترل؛ (B) اتانول (10 mg/kg)؛ (C) اتانول (10 mg/kg) + عصاره بادرنجبویه (200 mg/kg)؛ (D) اتانول (10 mg/kg) + عصاره بادرنجبویه (400 mg/kg). فلش سیاه رنگ نشان دهنده افزایش لومن لوله های سمینفر و فلش قرمز رنگ بیانگر کاهش ضخامت اپیتلیوم لوله های سمینفر و فلش آبی ادم را بین لوله ها نشان می دهد. رنگ آمیزی بارنگ هماتوکسیلین-ئوزین صورت گرفته است. تصاویر با بزرگنمایی $\times 10$ تهیه شده است. Scale bar=100μm

تصویر شماره 1 میکروگرافی از بافت بیضه را در گروه ها نشان می دهد. شکل شماره 1-A مربوط به گروه کنترل می باشد که کاملاً ساختار بافتی نرمالی دارند. ضخامت اپیتلیوم لوله سمی نیفر زیاد می باشد و تعداد اسپرما توزوئیدها در داخل لومن به فراوانی دیده می شود. تصویر شماره 1-B نشان می دهد حیواناتی که

بحث

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که تزریق درون-صفافی اتانول سبب افزایش ذرات فعال اکسیژن، لیپیدپراکسیداسیون، پروتئین کربونیل، نیتریک اکسید و کاهش گلوکاتایون در بافت بیضه شد. همچنین ضایعات پاتولوژی، کاهش در تحرک، تعداد و مرفولوژی نرمال اسپرم در گروه‌های تحت درمان با اتانول مشاهده شد، در حالی که تجویز بادرنبویه به شکل معناداری توانست استرس اکسیداتیو ناشی از اتانول را در بافت بیضه مهار کرده و سبب بهبود در ناهنجاری‌های اسپرم و ضایعات پاتولوژیک گردد. استرس اکسیداتیو و سمیت ناشی از رادیکال‌های آزاد به عنوان اولین و مهم‌ترین مکانیسم سمیت اتانول در بافت بیضه نقش دارد. درواقع استرس اکسیداتیو می‌تواند منجر به آسیب به مولکول‌های بزرگ سلولی مثل پروتئین و لیپید باعث اختلال در غشای و پاره شدن سلول و یا از طریق آسیب به DNA باعث شروع مرگ سلولی و درنهایت آسیب بافتی شود (26).

استرس اکسیداتیو ناشی از الکل با متابولیسم اتانول مرتبط است. سه مسیر متابولیکی اتانول تاکنون در بدن انسان توصیف شده است. هر یک از این سه مسیر الکل دهیدروژناز، سیستم اکسیداسیون میکروزومال (MEOS) و کاتالاز که می‌تواند رادیکال‌های آزاد ایجاد کند و بر سیستم آنتی‌اکسیدانی تأثیر می‌گذارند. استالید محصول متابولیسم اتانول است. یک متابولیت سیتوتوکسیک بسیار واکنش‌پذیر با میل ترکیبی بالا برای گروه‌های سولفیدریل درون سلول‌ها یا بافت‌ها است. این ماده قادر به واکنش کووالانسی با نوکلئوفیل‌ها، از جمله اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، اسیدهای آمینه، پپتیدها و پروتئین‌ها است. که عملکرد سلولی را از طریق سمیت مستقیم تغییر می‌دهند، در نتیجه آسیب بافتی با واسطه ایمنی ایجاد می‌شود (27، 28). عوارض جانبی مصرف الکل در سیستم تولیدمثل مردان شامل استرس اکسیداتیو، اختلال در تعادل هورمونی، کوچک شدن بیضه‌ها که منجر به ناتوانی جنسی، اختلالات غدد جنسی، تغییرات

ساختاری بیضه، کاهش تستوسترون بیضه و سرم، ناباروری و کاهش سایر خصوصیات جنسی ثانویه می‌شود (29، 30). اسپرماتوژنز، یک فرایند بسیار فعال که به اکسیژن‌رسانی بالایی نیاز دارد. افزایش استرس اکسیداتیو با آسیب رساندن به اسیدهای چرب اشباع‌نشده (PUFA) که غشاهای پلاسمایی اسپرماتوزوئید را تشکیل می‌دهد مانع فرایند اسپرماتوژنز می‌شود (31).

در مطالعه‌ای نشان داده شد که اتانول به طور مستقیم باعث مهار اسپرماتوژنز می‌شود، همچنین نشان داده شد که استالید بسیار قدرتمندتر از اتانول در بیضه رت عمل می‌کند. ROS و استالید از طریق واکنش با گلوکاتایون منجر به کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی وابسته به گلوکاتایون می‌شوند. به علاوه، تولید ROS نقش مهمی در تحرک اسپرم و از بین رفتن باروری دارد. مواجهه با الکل در اسپرم‌زایی و افزایش ناهنجاری‌های ساختاری اسپرم نقش دارد. سو استفاده طولانی مدت از اتانول همچنین باعث آتروفی بیضه و ناباروری در موش‌های الکلی می‌شود (32، 33). بنابراین با مهار استرس اکسیداتیو می‌توان جلوی مرگ سلول و نهایتاً آسیب بافتی را گرفت.

مطالعات فراوانی اثرات محافظتی و آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلیک و فلاونوئیدی را در مقابل آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد بیان کرده‌اند (34، 35). لذا گیاهانی که دارای این ترکیبات مؤثره در ساختار خود هستند دارای پتانسیل بالقوه مقابله با آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد می‌باشند.

برگ گیاه بادرنبویه (*Melissa officinalis*) حاوی فلاونوئیدها، ترکیبات پلی‌فنولیک، مونوترپن‌وئید، گلیکوزیدهای مونوترپن، تری‌ترپن‌ها سسکیترن‌ها، تانن‌ها و روغن‌های ضروری است (12). وجود مقادیر زیاد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فنلی قوی (مشتقات هیدروکسی سینیامیک اسید، رزمارینیک اسید، کلروژنیک اسید، کافنیک اسید) در *M. officinalis* فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن را تأیید کرد (36). *M. officinalis* در مطالعات مختلف استرس اکسیداتیو و سطح آنزیم‌های اکسیداتیو پلازما (کاتالاز، سوپراکسید

دیسموتاز، گلو تاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز) را بهبود بخشید. همچنین منجر به کاهش در آسیب DNA پلاسما، و پراکسیداسیون لیپیدها گردید (37).

نتایج یک مطالعه نشان داد که عصاره *M. officinalis* در کاهش صدمات اکسیداتیو ناشی از مالاتیون در بافت کبد و کلیه نقش دارد (38). بسیاری از مطالعات اثرات آنتی اکسیدانی *Melissa officinalis* را تأیید کردند. بنابراین، تأثیر آن در پیشگیری و درمان بیماری‌های در این مطالعه اثر تجویز مزمن اتانول بر روی فاکتورهای استرس اکسیداتیو (ROS)، نیتریک اکسید، لیپید پراکسیداسیون، پروتئین کربونیل و گلو تاتیون)، آسیب پاتولوژیک بیضه و پارامترهای آسیب به اسپرم مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مواجهه با اتانول با افزایش سطح ذرات فعال اکسیژن همراه بود و تجویز عصاره بادرنجبویه در گروه‌های تحت درمان به‌طور معنی‌داری سطح آن را کاهش داد شد. پراکسیداسیون لیپیدی به‌عنوان یکی از مارک‌های برجسته استرس اکسیداتیو محسوب می‌شود. یکی از محصولات قابل شناسایی فرایند اکسیداسیون اسیدهای چرب، مالون دی‌آلدئید است. از سویی دیگر غشای پلاسمایی اسپرماتوزوئیدها به‌ویژه به آسیب پراکسیداسیون حساس هستند زیرا آن‌ها به‌خوبی از PUFA برخوردار هستند که در برابر حمله ROS بسیار آسیب‌پذیر هستند (39). بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه تجویز عصاره بادرنجبویه توانست پراکسیداسیون لیپیدی ایجادشده توسط اتانول را در بافت بیضه مهار کند. گلو تاتیون یکی از مهم‌ترین دفاع آنتی اکسیدانی در بدن می‌باشد که نقش مهمی را در خنثی کردن ذرات فعال اکسیژن در سلول را به عهده دارد (32) و در این مطالعه تجویز عصاره بادرنجبویه توانست از تخلیه ذخایر گلو تاتیون توسط اتانول در بافت بیضه ممانعت کند. یکی دیگر از اجزای سلولی که تحت تأثیر آسیب اکسیداتیو قرار می‌گیرند پروتئین‌ها هستند. رادیکال‌های آزاد قادرند با حمله به پروتئین‌ها آن‌ها را تخریب و ساختار طبیعی

آن‌ها را به هم بریزند (40). طی این فرایند پروتئین کربونیل ایجاد می‌شود که به‌عنوان یک مارکر اکسیداتیو پروتئین‌ها محسوب می‌شود. در مطالعه حاضر نشان داده شد که مواجهه با اتانول با افزایش سطح پروتئین کربونیل در بیضه رت همراه بود که در گروه‌های تحت درمان با عصاره بادرنجبویه کاهش این مارکر مشاهده شد و توانست از آسیب اکسیداتیو پروتئین توسط اتانول جلوگیری کند. نیتریک اکسید به‌عنوان یک فاکتور التهابی جهت بررسی التهاب در بافت بیضه مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مواجهه با اتانول با افزایش سطح نیتریک اکسید همراه بود و تجویز عصاره بادرنجبویه در گروه‌های تحت درمان به‌طور معنی‌داری سطح آن را کاهش داد شد. در این مطالعه با تعیین تعداد اسپرم، تحرک و تغییرات مورفولوژیکی که مارک‌های حساس به آسیب بیضه هستند، مشاهده شد که تجویز عصاره بادرنجبویه اثرات قابل ملاحظه‌ای در کاهش ناهنجاری اسپرم ناشی از اتانول دارد. همچنین ارزیابی هیستوپاتولوژیک بافت بیضه در این مطالعه بیان کرد که در رت‌های تحت مواجهه با اتانول کاهش در ضخامت اپیتلیوم و تعداد اسپرماتوزوئید دیده می‌شود و قطر لومن افزایش یافته است، که عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه توانست به میزان قابل توجهی این آسیب را در ساختار بافتی کاهش دهد. از محدودیت‌های پژوهش حاضر عدم بررسی مسیرهای مختلف مکانیسمی بادرنجبویه و بیان آنزیمی و عدم تعیین ماده موثره بود. همچنین می‌توان به عدم به کارگیری گیاه بادرنجبویه با دیگر ترکیبات موثر بر کاهش آسیب تولید مثلی جهت بررسی اثر سینرژیسم اشاره کرد. بنابراین بررسی بیان آنزیمی و تعیین مسیرهای مکانیسمی مختلف بادرنجبویه (مسیرهای التهابی و آپاپتوز) جهت کاهش آسیب تولید مثلی توصیه می‌شود. همچنین پیشنهاد می‌شود اجزای گیاه بادرنجبویه جداسازی گردد و مطالعه روی هر جزء صورت پذیرد و اثر سینرژیسم گیاه بادرنجبویه با سایر داروهای کاهنده آسیب تولید مثلی بررسی شود.

به عنوان یک درمان مکمل در مواجهه با آسیب های بافتی ناشی از مواجهه مزمن با اتانول استفاده نمود.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه دکترای عمومی داروسازی خانم فاطمه امامقلی زاده با کد اخلاق IR.MAZUMS. REC.1399.1767 و کد طرح 1767 می باشد. منابع مالی این مطالعه توسط دانشگاه علوم پزشکی مازندران تأمین شده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می شود.

در پایان می توان نتیجه گیری کرد که تولید بیش از حد رادیکال های آزاد را می توان مهم ترین مکانیسم سمیت تولیدمثلی ناشی از مصرف مزمن اتانول دانست. طبق نتایج مطالعه ما تجویز عصاره گیاه بادرنجبویه توانست به طور معنی داری استرس اکسیداتیو را در بافت بیضه موش های صحرایی مهار نماید. با توجه به نتایج به دست آمده، بادرنجبویه اثرات محافظتی در برابر سمیت تولیدمثلی ناشی از اتانول نشان داد که احتمالاً به واسطه فعالیت آنتی اکسیدانی آن است. لذا می توان از این گیاه پس از بهره برداری و طی کردن مراحل آزمایش ها

References

1. Isidori AM, Pozza C, Gianfrilli D, Isidori A. Medical treatment to improve sperm quality. *Reprod Biomed Online* 2006; 12(6): 704-714.
2. Varga ZV, Matyas C, Paloczi J, Pacher P. Alcohol misuse and kidney injury: epidemiological evidence and potential mechanisms. *Alcohol Res* 2017; 38(2): 283 - 288.
3. Pressman A, Hernandez A, Sikka SC. Lifestyle stress and its impact on male reproductive health In: Sikka S, Hellstrom W, (eds). *Bioenvironmental issues affecting men's reproductive and sexual health* 14th ed. Massachusetts: Academic Press; 2018. p. 73-83.
4. Harikrishnan R, Abhilash P, Das SS, Prathibha P, Rejitha S, John F, et al. Protective effect of ascorbic acid against ethanol-induced reproductive toxicity in male guinea pigs. *Br J Nutr* 2013; 110(4): 689-698.
5. Akomolafe S, Obboh G, Akindahunsi A, Afolayan A. *Tetracarpidium conophorum* ameliorates oxidative reproductive toxicity induced by ethanol in male rats. *BMC Complement Altern Med* 2015; 15(1): 1-9.
6. Akbari A, Nasiri K, Heydari M, Mosavat SH, Iraj A. The protective effect of hydroalcoholic extract of *Zingiber officinale* Roscoe (Ginger) on ethanol-induced reproductive toxicity in male rats. *J Evid Based Complementary Altern Med* 2017; 22(4): 609-617.
7. Nishi K, Ramakrishnan S, Gunasekaran VP, Parkash K, Ramakrishnan A, Vijayakumar N, et al. Protective effects of p-coumaric acid on ethanol induced male reproductive toxicity. *Life Sci* 2018; 209: 1-8.
8. Alirezai M, Kheradmand A, Heydari R, Tanideh N, Neamati S, Rashidipour M. Oleuropein protects against ethanol-induced oxidative stress and modulates sperm quality in the rat testis. *Med J Nutrition Metab* 2012; 5(3): 205-211.
9. He Y, Zeng F, Liu Q, Ju W, Fu H, Hao H, et al. Protective effect of magnesium isoglycyrrhizinate on ethanol-induced testicular injuries in mice. *J Biomed Res* 2010; 24(2): 153-160.
10. Karimi S, Hosseini-mehr SJ, Mohammadi HR, Khalatbary AR, Amiri FT. *Zataria multiflora* ameliorates cisplatin-induced testicular damage via suppression of oxidative stress and

- apoptosis in a mice model. Iran J Basic Med Sci 2018; 21(6): 607-614.
11. Siervo GE, Vieira HR, Ogo FM, Fernandez CD, Gonçalves GD, Mesquita SF, et al. Spermatic and testicular damages in rats exposed to ethanol: influence of lipid peroxidation but not testosterone. Toxicology 2015; 330: 1-8.
 12. Miraj S, Rafieian-Kopaei, Kiani S. Melissa officinalis L: A Review study with an antioxidant prospective. J Evid Based Complementary Altern Med 2017; 22(3): 385-394.
 13. Sofowora A, Ogunbodede E, Onayade A. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. Afr J Tradit Complement Altern Med 2013; 10(5): 210-229.
 14. Draginic N, Jakovljevic V, Andjic M, Jeremic J, Srejovic I, Rankovic M, et al. Melissa officinalis L. as a Nutritional Strategy for Cardioprotection. Front Physiol 2021; 12: 661778.
 15. Behnam Rassouli M, Ghayour N, Afsharian M, Tehranipour M, Ghayour MB. The protective effects of Melissa officinalis leaves usage on learning disorder induced by lead acetate administration during pre and postnatal periods in rats. J Arak Univ Med Sci 2010; 13(1): 97-104 (Persian).
 16. Zarei A, Changizi-Ashtiyani S, Taheri S, Hosseini N. A brief overview of the effects of Melissa officinalis L. extract on the function of various body organs. Zahedan J Res Med Sci 2015; 17(7): 1-6.
 17. Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh MA. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. Pak J Pharm Sci 2009; 22(3): 277-281.
 18. Vahidirad M, Arab-Nozari M, Mohammadi H, Zamani E, Shaki F. Protective effect of captopril against diazinon induced nephrotoxicity and neurotoxicity via inhibition of ROS-NO pathway. Drug Chem Toxicol 2018; 41(3): 287-293.
 19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72(1-2): 248-254.
 20. Vahidirad M, Arab-Nozari M, Mohammadi H, Shaki F. Protective effect of edaravone against nephrotoxicity and neurotoxicity of acute exposure to Diazinon. J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28(165): 175-182 (Persian).
 21. Shaki F, Hosseini M-J, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of depleted uranium on isolated rat kidney mitochondria. Biochim Biophys Acta Gen Subj 2012; 1820(12): 1940-1950.
 22. Kabel AM. Zinc/alogliptin combination attenuates testicular toxicity induced by doxorubicin in rats: Role of oxidative stress, apoptosis and TGF- β 1/NF- κ B signaling. Biomed Pharmacother 2018; 97: 439-449.
 23. Naderi M, Ahangar N, Shaki F. Zinc and selenium protects against sodium valproate induced nephrotoxicity through modulation of oxidative stress. J Mazandaran Univ Med Sc 2016; 26(141): 111-122 (Persian).
 24. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. Analytical biochemistry. 1982; 126(1): 131-138.
 25. Koohsari M, Ahangar N, Mohammadi E, Shaki F. Effects of tramadol administration on male reproductive toxicity in Wistar rats The role of oxidative stress, mitochondrial

- dysfunction, apoptosis-related gene expression, and nuclear factor kappa B signalling. Bratisl Lek Listy 2020; 121(6): 400-410.
26. Zima T, Fialová L, Mestek O, Janebová M, Crkovská J, Malbohan I, et al. Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. J Biomed Sci 2001; 8(1): 59-70.
 27. Rusyn I, Bataller R. Alcohol and toxicity. J Hepatol 2013; 59(2): 387-388.
 28. Dosumu OO, Akinola OB, Akang EN. Alcohol-induced testicular oxidative stress and cholesterol homeostasis in rats-The therapeutic potential of virgin coconut oil. Middle East Fertil Soc J 2012; 17(2): 122-128.
 29. Akang EN, Oremosu AA, Osinubi AA, James AB, Biose IJ, Dike SI, et al. Alcohol-induced male infertility: Is sperm DNA fragmentation a causative? Journal of Experimental and Clinical Anatomy. 2017;16(1):53.
 30. Ramgir SS, Abilash V. Impact of Smoking and Alcohol Consumption on Oxidative Status in Male Infertility and Sperm Quality. Indian J Pharm Sci 2019; 81(5): 933-945.
 31. Asadi N, Bahmani M, Kheradmand A, Rafieian-Kopaei M. The impact of oxidative stress on testicular function and the role of antioxidants in improving it: a review. J Clin Diagn Res 2017; 11(5): IE01-IE05.
 32. Shaki F, Arab-Nozari M, Elahi P, Ghasemi M, Habibi E. Ameliorative effect of *Viola odorata* L. ethyl acetate extract against nephrotoxicity induced by chronic ethanol exposure in rats. J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29(175): 1-13 (Persian).
 33. Talebi AR, Sarcheshmeh AA, Khalili MA, Tabibnejad N. Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. Alcohol 2011; 45(4): 403-409.
 34. Kamdem JP, Adeniran A, Boligon AA, Klimaczewski CV, Elekofehinti OO, Hassan W, et al. Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection. Ind Crops Prod 2013; 51: 26-34.
 35. Mahboubi M. *Melissa officinalis* and rosmarinic acid in management of memory functions and Alzheimer disease. Asian Pac J Trop 2019; 9(2): 47-52.
 36. Zeraatpishe A, Oryan S, Bagheri MH, Pilevarian AA, Malekiran AA, Baeeri M, et al. Effects of *Melissa officinalis* L. on oxidative status and DNA damage in subjects exposed to long-term low-dose ionizing radiation. Toxicology Ind Health 2011; 27(3): 205-212.
 37. Martins EN, Pessano NT, Leal L, Roos DH, Folmer V, Puntel GO, et al. Protective effect of *Melissa officinalis* aqueous extract against Mn-induced oxidative stress in chronically exposed mice. Brain Res Bull 2012; 87(1): 74-79.
 38. Sief M, Khalil F, Abou-Arab A, Abou Donia M, El-Sherbiny A, Mohamed S. Ameliorative role of *Melissa officinalis* against hepatorenal toxicities of organophosphorus malathion in male rats. MOJ Toxicol 2015; 1(3): 00013.
 39. Aitken RJ, Gibb Z, Baker MA, Drevet J, Gharagozloo P. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. Reprod Fertil Dev 2016; 28(2): 1-10.
 40. alle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin Chim Acta 2003; 329(1-2): 23-38.