ORIGINAL ARTICLE

Effect of Co-administration of Astragalus hamosus L. ethanolic Extract and Metformin on Reproductive Parameters in Diabetic Male Rats

Behzad Mesbahzadeh[1],
Mohammadmehdi Hassanzadeh-Taheri[2],
Khadijeh Vazifeshenas-Darmiyan[3],
Negar Moodi[4],
Mehran Hosseini[5]

[1] Assistant Professor, Department of Physiology and Pharmacology, School of Allied Medical Sciences, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
[2] Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
[3] PhD Student in Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
[4] Medical Student, Student Research Committee, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
[5] MSc in Anatomical Sciences, Cellular and Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

(Received September 19, 2021 ; Accepted January 23, 2022)

Abstract

Background and purpose: The seeds of *Astragalus hamosus* L. are prescribed for many therapeutic purposes in Traditional Persian Medicine. The present study aimed to investigate the combined effects of metformin and ethanolic extract of *Astragalus hamosus* L. (AH) on glucose and reproductive parameters in diabetic male rats.

Materials and methods: Ethanolic extract of AH was prepared using maceration method. Diabetic male Wistar rats were orally treated with 500 mg/kg metformin (MET500), 150 mg/kg AH, (AH150), 300 mg/kg AH (AH300), and combination of metformin and AH (MET+AH150 and MET+AH300) for 28 consecutive days. Then, fasting blood glucose (FBG), plasma testosterone, sperm quality (count, motility, and viability), testis histopathology, and testicular lipid peroxidation (MDA) were evaluated.

Results: Compared with the untreated diabetic group, AH treatment significantly improved testosterone level, sperm count, motility, and viability and decreased testicular MDA (all $P<0.01$) but it could not change glucose level ($P>0.05$). AH co-administration with metformin significantly potentiated the beneficial effects of metformin on testosterone ($P<0.01$) and testicular lipid peroxidation at both doses ($P<0.001$). While AH co-therapy with metformin at the maximum dose (300 mg/kg) synergistically improved metformin effects on testis morphology (all $P<0.05$), it could not show a positive combined effect on sperm parameters.

Conclusion: AH has no antidiabetic effect and its co-therapy with metformin does not alter the hypoglycemic effect of metformin. However, this combination therapy has a synergistic effect on regulating lipid peroxidation, testosterone level, and testicular histological alterations in diabetic rats.

Keywords: diabetes, metformin, *Astragalus* plant, sperm, testis

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 31 (206): 14-29 (Persian).

*** Corresponding Author: Mehran Hosseini-** Cellular and Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran. (E- mail: mehranhosseiny@yahoo.co.in)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و یکم شماره 206 اسفند سال 1400 (29-14)

بررسی اثر مصرف همزمان عصاره الکلی اکلیل‌الملک و مت‌فورمین بر پارامترهای تولید مثلی موش‌های صحرایی دیابتی نر

بهزاد مصباح زاده[1]
محمد مهدی حسن زاده طاهری[2]
خدیجه وظیفه شناس درمیان[3]
نگار مودی[4]
مهران حسینی[5]

چکیده

سابقه و هدف: در طب سنتی ایران دانه‌های گیاه اکلیل‌الملک (*Astragalus hamosus L.*) جهت اهداف درمانی متعددی توصیه می‌شوند. این مطالعه با هدف بررسی اثرات مصرف همزمان مت‌فورمین و عصاره الکلی‌اکلیل‌الملک بر گلوکز و پارامترهای تولید مثلی در موش‌های نر دیابتی اجرا شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی عصاره الکلی اکلیل‌الملک به روش خیساندن تهیه شد. موش‌های صحرایی نر دیابتی به مدت 28 روز متوالی با مت‌فورمین (500 mg/kg) و عصاره اکلیل‌الملک در دوزهای 150mg/kg و 300mg/kg به‌صورت جداگانه و یا ترکیبی، به‌صورت خوراکی تیمار شدند. در پایان پارامترهای قند خون ناشتا، تستوسترون، کیفیت اسپرم (تعداد، تحرک، حیات)، بافت‌شناسی و پراکسیداسیون لیپیدی بیضه‌ها ارزیابی شدند.

یافته‌ها: در مقایسه با موش‌های دیابتی تیمار نشده، عصاره اکلیل‌الملک سطح تستوسترون و پارامترهای اسپرمی (تعداد، تحرک و حیات) را به‌طور معنی‌داری ارتقا و پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش داد ($P<0/01$)، اما اثر کاهنده قند خون نداشت ($P>0/05$). مصرف همزمان عصاره با مت فورمین اثرات سودمند مت فورمین بر روی تستوسترون ($P<0/01$) و پراکسیداسیون لیپیدی ($P<0/001$) را افزایش داد. مصرف همرمان عصاره در بالاترین دوز (300 mg/kg) با مت فورمین توانست به‌طور معنی‌داری اثرات مت فورمین بر شاخص‌های بافت شناسی بیضه را بهبود بخشد (همگی $P<0/05$)، اما تاثیر معنی‌داری بر روی پارامترهای اسپرمی نداشت.

استنتاج: اکلیل الملک اثر کاهنده قندخون ندارد و مصرف همزمان آن با مت‌فورمین تداخلی در اثرات کاهنده قندخون این دارو ایجاد نمی‌کند. اما اثر هم افزایی مثبتی در بهبود پراکسیداسیون لیپیدی، سطح تستوسترون و بافت‌شناسی بیضه با مت فورمین دارد.

واژه های کلیدی: دیابت، مت‌فورمین، اکلیل‌الملک، اسپرم، بیضه

مقدمه

امروزه اهمیت بیماری دیابت و ضرورت کنترل آن بر کسی پوشیده نیست. آمارهای جهانی نشان می‌دهند که در سال 2017 میزان بروز این بیماری در دنیا برابر 22/9 میلیون و شیوع آن در همین سال برابر 476 میلیون

مولف مسئول: مهران حسینی- بیرجند: دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی E-mail: Mehranhosseiny@yahoo.co.in
1. استادیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران
2. استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران
3. دانشجوی دکترای تخصصی بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
4. دانشجوی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران
5. کارشناس ارشد علوم تشریحی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران
تاریخ دریافت: 1400/6/28 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/7/20 تاریخ تصویب: 1400/11/3

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

مورد بوده است، که از این تعداد 1/37 میلیون نفر به‌دلیل این بیماری جان خود را از دست داده‌اند. همچنین مطالعات اپیدمیولوژیک پیش‌بینی کرده‌اند که به ترتیب بروز، شیوع و مرگ و میر سالیانه ناشی از این بیماری در سال 2025 به 26/6 میلیون، 570/9 میلیون و 1/59 میلیون نفر برسد(1). جدیدترین برآوردها نشان می‌دهند که 15 درصد جمعیت ایران مبتلا به دیابت و حدود 25 درصد نیز پیش دیابتی هستند که این آمار نشان‌دهنده شیوع بالا و رو به افزایش این بیماری در کشور می‌باشد(2). بیماری دیابت در بلندمدت با عوارض مهمی همراه است و یافته‌های بالینی و همچنین مطالعات تجربی نشان داده‌اند که این بیماری از طریق اثرگذاری بر روی دستگاه‌های مهم بدن نظیر بینایی، ادراری و همچنین عصبی می‌تواند در عملکرد این دستگاه‌ها اختلال ایجاد کرده و به دنبال آن ضمن کاهش چشمگیر کیفیت زندگی بیماران موجب افزایش مرگ و میر در آن‌ها شود(7-3). علاوه بر موارد یاد شده، دیابت همچنین با تاثیر بر روی دستگاه تولید مثل می‌تواند عملکرد آن را دچار اختلال کند. در گذشته چون بیماری دیابت در سنین بالا بروز بیش‌تری داشت اثرات آن بر روی سیستم تولید مثلی چندان مورد توجه نبود. امروزه با توجه به این‌که روند ابتلای این بیماری تمایل به سمت ابتلای افراد جوان‌تر را از خود نشان می‌دهد، بررسی و کنترل عوارض آن بر روی دستگاه تولید مثل نیز مورد توجه قرار گرفته است(8).

شواهد متعددی وجود دارند که نشان می‌دهند دیابت صرف نظر از نوع آن به واسطه ایجاد شرایط هایپرگلایسمی و به تبع آن سیکل معیوب ایجاد آسیب‌های استرس اکسیداتیو، شکست DNA، اختلال عملکرد میتوکندریایی، فعال شدن و تداوم شرایط التهابی و... سبب کاهش قدرت باروری در مردان می‌شود(9). با توجه به این‌که شاه‌کلید عوارض نامطلوب دیابت بر روی سیستم تولیدمثل، فعالیت‌های استرس اکسیداتیو عنوان شده است و سایر وقایع سلولی و مولکولی درگیر در این پروسه توسط این فعالیت‌ها آغاز شده، تشدید می‌شوند و تداوم می‌یابند، کنترل استرس اکسیداتیو یکی از رویکردهای مهم پیشگیرانه و درمانی عوارض دیابت بالاخص عوارض آن بر روی دستگاه تولید مثل به شمار می‌آید(۱۰،۱۱). استفاده از ترکیبات طبیعی و گیاهان دارویی یکی از رویکردهای رایج در طب مکمل است. مطالعات نشان داده‌اند که گیاهان دارویی و ترکیبات طبیعی ضمن داشتن خواص متعدد نظیر خاصیت آنتی‌اکسیدانی از اقبال عمومی بهتری در مقایسه با داروهای رایج بر خوردارند و شمار قابل توجهی از بیماران دیابتی غالبا به‌صورت همزمان و یا به تنهایی از گیاهان دارویی در کنار داروهای اصلی خود استفاده می‌کنند(14-12).

یکی از گیاهان دارویی که به راحتی در دسترس عموم مردم می‌باشد، اکلیل‌الملک است. اکلیل الملک که با نام ناخنک نیز در ایران شناخته می‌شود جهت درمان سنگ‌کلیه، بیماری‌های روماتیسمی و...توسط فروشگاه‌های عرضه‌کننده گیاهان دارویی به فروش می‌رسد و یکی از مطالعات میدانی نشان داده است که این گیاه یکی از اقلام پر فروش عطاری‌های شهر مشهد می‌باشد(15). نام علمی اکلیل‌الملک *Astragalus hamosus* L. است که متاسفانه در بسیاری از کتب مرجع گیاه‌شناسی در ایران به اشتباه *Melilotus officinalis* عنوان شده که ما در مطالعه قبلی خود به این مورد اشاره کردیم(16). در طب سنتی از دانه‌های این گیاه که درون غلاف نازکی قرار گرفته‌اند و منظره‌ای هلالی شکل دارند، استفاده می‌شود. تیم تحقیقاتی دکتر زرشناس در شیراز مطالعه گیاه‌شیمی جامعی را بر روی اکلیل‌الملک انجام داده‌اند که یافته‌های آنان نشان می‌دهد دانه‌های این گیاه حاوی ترکیباتی نظیر اسید آمینه‌های آزاد، قندهای محلول، پلی‌فنول‌ها، تری‌ترپن‌ها، گلیکوزیدها، گلیکولیپیدها و درصد قابل توجهی از اسیدهای چرب بلند زنجیر غیر اشباع (PUFA) می‌باشد(17). به‌نظر می‌رسد اثرات سودمند اکلیل‌الملک به‌دلیل پروفایل اسیدهای چرب تشکیل‌دهنده آن باشد و تحقیقات گذشته نشان داده‌اند که اسیدهای چرب نقش مهمی درعملکرد دستگاه تولیدمثلی جنس نر دارند(20-18).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

مطالعات قبلی بیان کرده‌اند که عصاره آبی و یا الکلی اکلیل‌الملک دارای خواص ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی است و همچنین اثرات محافظت‌کنندگی کبدی در برابر مواد شیمیایی-کارسینوژن را دارد(23-21). بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی (جلوگیری از پراکسیداسیون لینولئیک اسید) و مهار رادیکال‌های آزاد (free radical scavenging) عصاره متانولی اکلیل‌الملک نشان داده است که این گیاه خاصیت مهار پراکسیداسیون لیپیدی بیش‌تر از ترولوکس (آنالوگ هیدروفیل ویتامین E و کوئرستین را دارد اما خاصیت خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد آن حدود سه برابر کم‌تر از ترولوکس و کوئرستین می‌باشد، با این حال از گیاهانی مثل موسیر (*Allium hirtifolium* Boiss) و حنظل (*Citrulus colocynthis* L Schrad) توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد بیش‌تری دارد(24). نتایج مطالعه قبلی ما نیز نشان داد این گیاه تا دوز 2000mg/kg اثرات سمیت حاد بر روی موش صحرایی ندارد و همچنین مصرف تحت حاد خوراکی آن (28 روز) تا دوز 300 mg/kg اثر سمیت خاصی بر ارگان‌های حیاتی بدن موش‌های صحرایی (از جمله گنادها) از خود نشان نداد(16). با توجه به غنی بودن دانه‌های اکلیل‌الملک از اسیدهای چرب PUFA و همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن در مهار پراکسیداسیون لیپیدی، این مطالعه با هدف بررسی اثرات مصرف همزمان عصاره الکلی اکلیل‌الملک با داروی مت‌فورمین (یکی از رایج‌ترین داروهای کنترل دیابت) در موش‌های نر دیابتی طراحی و اجرا شد.

مواد و روش ها

حیوانات: در این پژوهش تجربی از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با دامنه وزنی 220-200 گرم (9-8 هفته) که از مرکز تحقیقات طب تجربی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند خریداری شدند، استفاده شد. قبل از شروع طرح جهت تطابق با محیط، حیوانات به مدت یک هفته بدون دریافت هیچ‌گونه مداخله نگهداری شدند. در طول مدت پژوهش حیوانات در شرایط استاندارد (سیکل تاریکی/روشنایی 12 ساعته، دمای 2 ±22 درجه سانتی‌گراد و رطوبت 30-25 درصد) درون قفس‌های پلاستیکی از جنس پلی‌پروپیلن (شرکت رازی راد-ایران) نگهداری شدند. حیوانات همگی و در طول طرح دسترسی آزادانه به آب شهری و غذای استاندارد حیوانات آزمایشگاهی (شرکت بهپرور، ایران) داشتند. شرح کار با حیوانات مطابق شرح پیرو به تصویب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بیرجند رسید (IR.BUMS.REC.1396.17).

روش عصاره گیری: گیاه اکلیل الملک در اواخر فصل بهار (زمان رسیدن دانه‌ها) از مراتع اطراف شهرستان بیرجند تهیه شد. سپس توسط گیاه‌شناس مجرب شناسایی و هویت آن تایید گردید و یک نمونه کامل آن نیز در هرباریوم دانشکده کشاورزی آرشیو شد (کد: 125). غلاف‌های تازه اکلیل‌الملک جدا شد و در سایه و دمای اتاق خشک گردید. سپس دانه‌ها جدا شده و توسط آسیاب برقی کوچک پودر شدند. پودر به‌دست آمده با نسبت 1:10 (حجم:وزن) با الکل 80 درجه به‌مدت 48 ساعت روی همزن مغناطیسی در دمای اتاق قرار گرفت. محلول حاصله پس از صاف شدن با فیلترهای با درجه تخلخل نزولی و در نهایت با کاغذ صافی (Blue Ribbon 589، آلمان) فیلتر شد. محلول به دست آمده به کمک دستگاه روتاری اواپراتور تغلیظ شد و در نهایت هر 10 میلی‌لیتر از محلول غلیظ شده به یک عدد پتری دیش 12سانتی‌متری منتقل شده و درون آون و در دمای 45 درجه سانتی‌گراد باقی مانده حلال آن، ظرف مدت 24 ساعت تبخیر و پودر باقی مانده جمع‌آوری شد(25). بازدهی عصاره‌دهی حدود 20 درصد بود.

روش دیابتی کردن: ایجاد دیابت در موش‌ها با استفاده از تزریق ماده استرپتوزوتوسین(سیگما، آمریکا) انجام شد. بدین منظور موش‌های ناشتا با دوز 55 mg/kg استرپتوزوتوسین حل شده در نرمال سالین سرد مورد تزریق درون صفاقی قرار گرفتند(26). 72 ساعت پس از تزریق، موش‌های با قند خون ناشتای بیش‌تر از 350 mg/dL به

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

عنوان دیابتی در نظر گرفته شده و وارد مطالعه شدند(14،27). قابل ذکر است باتوجه به این که بیش‌ترین تلفات موش‌های دیابتیک در دو هفته نخست پس از تزریق ماده دیابتوژن اتفاق می‌افتد و از طرفی ایجاد عوارض دیابتی نیاز به صرف زمان دارد، موش‌های دیابتی شده در تعداد بیش از نیاز و به‌مدت 4 هفته بدون هیچ مداخله‌ای نگهداری شدند(28).

گروه‌بندی و انجام مداخلات: در نهایت 48 سر موش با قندخون ناشتای بیش‌تر از 350 mg/dL به‌طور تصادفی به شش گروه مساوی (هر گروه 8 سر) تقسیم شدند و یک گروه (8 سر) از موش‌های همسن اما غیر دیابتی نیز به عنوان گروه کنترل انتخاب شد. گروه‌ها براساس شرح پیرو به مدت 28 روز متوالی تیمار شدند:

گروه 1 (کنترل): موش‌های سالم غیر دیابتی که با حجم 1 سی سی نرمال سالین گاواژ شدند.

گروه 2 (مدل دیابت): موش‌های دیابتی که با حجم 1 سی سی نرمال سالین گاواژ شدند.

گروه3 (مت فورمین): موش‌های دیابتی که با دوز 500mg/kg مت فورمین (گلوکوفاژ-فرانسه) گاواژ شدند(14،26).

گروه4 (عصاره 150mg/kg): موش‌های دیابتی که با دوز 150mg/kg عصاره اکلیل‌الملک گاواژ شدند.

گروه5 (عصاره 300mg/kg): موش‌های دیابتی که با دوز 300mg/kg عصاره اکلیل‌الملک گاواژ شدند.

گروه6 (مت‌فورمین+ عصاره 150mg/kg): موش‌های دیابتی که با دوز ترکیبی 500mg/kg مت‌فورمین و 150mg/kg عصاره اکلیل‌الملک مورد گاواژ قرار گرفتند.

گروه 7 (مت‌فورمین+ عصاره 300mg/kg): موش‌های دیابتی که با دوز ترکیبی 500mg/kg مت‌فورمین و 300mg/kg عصاره اکلیل‌الملک مورد گاواژ قرار گرفتند.

تیمار موش‌ها به‌صورت خوراکی و روزانه یک نوبت برای 28 روز متوالی انجام شد. قابل ذکر است دوزهای عصاره براساس مطالعات قبلی که درآن‌ها تجویز خوراکی اثرات ضد التهابی و ضد آلزایمری را نشان داده بودند و در دوزهای یاد شده هیچ اثر سمی گزارش نشده بود، انتخاب شدند(16،22،29). دوز مت فورمین در موش‌های دیابتی براساس مطالعات قبلی که دامنه 50-500 mg/kg انجام شده اند مورد مقایسه قرار گرفت و باتوجه به اثرات آن در کنترل قندخون و سایر عوارض دیابت در مدت زمان 28 روز، دوز 500 mg/kg برای این مطالعه انتخاب شد(13،26،27،30). تهیه محلول عصاره به‌صورت روزانه انجام شد. قبل از شروع مداخلات همه موش‌ها وزن شده و هر هفته نیز وزن‌گیری مجدد از آن‌ها انجام شد. جهت تهیه عصاره دوز مورد نیاز برای هر موش محاسبه و مقدار مورد نیاز عصاره یا پودر مت‌فورمین برای هر موش درون لوله آزمایش جداگانه با یک سی‌سی نرمال سالین حل شده و گاواژ شد. به عنوان مثال برای یک موش 200 گرمی از گروه 7 (مت‌فورمین+عصاره 300mg/kg) درون یک لوله آزمایش 60 میلی‌گرم عصاره به همراه 100 میلی‌گرم مت‌فورمین ریخته شد و سپس در یک سی‌سی نرمال سالین حل شده و به موش مربوطه گاواژ شد.

روش نمونه‌برداری: پس از 4 هفته مداخله، حیوانات یک شب ناشتا شده و در روز 29، پس از توزین با استفاده از تزریق درون صفاقی ترکیب کتامین (65mg/kg) و زایلازین (10 mg/kg) بیهوش شدند(31). خونگیری مستقیم از قلب موش‌ها انجام شد و سرم خون با استفاده از سانتریفیوژ (دور 2600 به مدت 15 دقیقه) جدا شد که برای ارزیابی قند خون و غلظت تستوسترون مورد استفاده قرار گرفت. بیضه راست هر موش بلافاصله برداشته و توزین شد و سپس درون ظرف حاوی پارافرمالدهید 4 درصد جهت تثبیت قرار گرفت. یک نمونه به جرم 100 میلی‌گرم از بافت بیضه چپ نیز درون ظرف نگهداری نمونه‌های منجمد (Cryovial) قرار داده شده و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز گردید تا جهت انجام آزمایش پراکسیداسیون لیپیدی مورد استفاده قرار گیرد. بلافاصله پس از خونگیری و نمونه برداری از بیضه‌ها، اپیدیدیم بیضه چپ هر موش جدا شده و به درون پتری دیش استریل منتقل شد و سپس قسمت دم اپیدیدیم توسط دو

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

عدد تیغ جراحی شماره 11 قطعه قطعه شده و دو میلی‌لیتر محلول همزفتن (Ham's F10) حاوی 0/5 درصد آلبومین سرم گاوی (BSA) که قبلا در دمای 37 درجه گرم شده بود به پلیت اضافه گردیده و به مدت 30 دقیقه درون انکوباتور CO_2 قرار گرفت (5 درصد CO_2، 37°C). جهت انجام شمارش اسپرم 10 میکرولیتر از سوسپانسیون با 190 میکرولیتر نرمال سالین سرد رقیق شد و سپس 10 میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق شده بر روی لام هموسیتومتر که لامل سنگی روی آن قرار داده شده بود، منتقل و شمارش تعداد اسپرم‌ها با بزرگنمایی 100 برابر انجام شد(32).

جهت ارزیابی تعداد اسپرم‌های متحرک، 10 میکرولیتر از سوسپانسیون اصلی (رقیق نشده) برداشته شد و بر روی یک لام معمولی میکروسکوپی که قبلا درون انکوباتور گرم شده بود منتقل شده و یک لامل معمولی روی آن قرار داده شد. لام بلافاصله در فاز کنتراست با بزرگ‌نمایی 400 برابر مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین‌منظور حداقل 10 فیلد میکروسکوپی بازدید شد و تعداد کل اسپرم‌های مشاهده شده و همچنین اسپرم‌های متحرک ثبت شدند(27).بررسی حیات اسپرم‌ها با استفاده از تکنیک رنگ‌آمیزی ائوزین - نگروزین انجام شد. به‌طور خلاصه 10 میکرولیتر از سوسپانسیون اصلی با 10 میکرولیتر از محلول ائوزین - نگروزین (حاوی 1/6 درصد ائوزین و 10 درصد نگروزین) درون میکروتیوب و با پیپتاژ آرام مخلوط شد و سپس اسمیر از این محلول تهیه و در دمای اتاق خشک شد. اسلایدها با میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی 1000 برابر مورد ارزیابی قرار گرفتند (10 الی 20 فیلد میکروسکوپی برای هر لام). اسپرم‌های با سر رنگ شده (صورتی) به عنوان اسپرم‌های مرده و اسپرم‌های با سر بی‌رنگ یا بسیار کم رنگ به عنوان زنده دسته‌بندی شدند و تعداد آن‌ها در هر فیلد ثبت شد(27).

انجام آزمایشات بیوشیمیایی: اندازه‌گیری قندخون موش‌ها با استفاده از کیت قندخون شرکت بیونیک (ایران) و دستگاه اتوآنالایزر شرکت هیتاچی (ژاپن) انجام شد. اندازه‌گیری هورمون تستوسترون با استفاده از کیت ارزیابی تستوسترون حیوانی (مونوبایند، آمریکا) و دستگاه خوانشگر الایزا انجام شد.

سنجش پراکسیداسیون لیپیدی: پراکسیداسیون لیپیدی در بافت بیضه با اندازه‌گیری سطح مالون‌دی‌آلدهید (MDA) که در واقع یک محصول نهایی پروسه پراکسیداسیون می‌باشد، مورد سنجش قرار گرفت. جهت آماده‌سازی هر نمونه 100 میلی‌گرم از بافت بیضه در 900 میکرولیتر بافرفسفات(0/1 مولار) سرد هموژن گردید، سپس به‌مدت 15 دقیقه با دور 3000 در دمای 4 درجه سانتریفیوژ شده و محلول رویی جهت سنجش غلظت پروتئین و پراکسیداسیون لیپیدی جمع‌آوری شد. 20 میکرولیتر از محلول رویی جهت سنجش پروتئین با 200 میکرولیتر واکنشگر رنگ آبی کوماسی(G250) مخلوط شد و به مدت 10دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. در نهایت جذب نمونه‌ها توسط خوانشگر الایزا در طول موج 595 نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تهیه منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی (10 الی 100 میکروگرم در سی‌سی) استفاده شد(31).

با استفاده از محلول استوک تتراتوکسی پروپان (4/18 مولار) هفت غلظت استاندارد به‌صورت سریالی (40-0/625 میکرومولار) تهیه شد. برای سنجش غلظت MDA، 100 میکرولیتر از سوپرناتانت نمونه (یا استاندارد) با 600 میکرولیتر اسید فسفریک 1درصد و 200 میکرولیتر تیوباربیتوریک اسید 0/67 درصد مخلوط شد(33). سپس لوله‌ها درون بن ماری و در دمای 90 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 60 دقیقه انکوبه شدند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، نمونه‌ها به ظرف حاوی آب و یخ منتقل شده تا واکنش متوقف شود و به هر نمونه 800 میکرولیتر ان-بوتانول اضافه شد و توسط شیکر مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت 20 دقیقه با دور 5000 در دمای 4 درجه سانتریفیوژ شده و محلول رویی آن‌ها (مایع صورتی رنگ) برداشته شد و جذب هر نمونه در طول موج 532

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

نانومتر خوانش شد. در نهایت با توجه به غلظت پروتئین هر نمونه، مقدار MDA بصورت نانومول بر میلی‌گرم پروتئین (nmol/mg) گزارش گردید(34).

انجام آزمایشات بافت شناسی: پس از تثبیت بافت بیضه‌ها در محلول پارافرمالدهید، با یک برش عرضی هر بیضه به دو قسمت تقسیم شد. سپس مراحل آبگیری با استفاده از عبور دادن نمونه‌ها از سری صعودی الکل (100-70 درجه) هر یک به مدت 1 ساعت انجام شد و شفاف‌سازی بافت‌ها نیز با عبور دادن نمونه‌ها از دو ظرف گزیلل صورت گرفت (هر ظرف 45 دقیقه). سپس 3 ساعت نمونه‌ها در سه ظرف حاوی پارافین مذاب قرار گرفتند و نهایتا بلوک‌های پارافینی از نمونه‌ها به‌دست آمد. از هر نمونه 30 برش بافت شناسی (10 لام) با استفاده از دستگاه میکروتوم (لیتز، ایتالیا) با ضخامت 5 میکرومتر تهیه شد. لام‌ها پس از پارافین زدایی با گزیلل و آبدهی (سری نزولی الکل)، با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. جهت ارزیابی بافت‌شناسی از هر موش 3 لام و از هر لام 10 میدان میکروسکوپی مشاهده و با استفاده از دوربین متصل به میکروسکوپ که با کمک لام هموسیتومتر و با دقت 0/01 میکرومتر از قبل کالیبره شده بود عکس برداری انجام شد. در نهایت عکس‌های مربوط به هر گروه به کمک نرم‌افزار آنالیز تصاویر (Image J, NIH) مورد آنالیز کمی قرارگرفتند. به‌طور خلاصه برای اندازه‌گیری مساحت سطح مقطع هر لوله اسپرم ساز با استفاده از گزینه ROI حدود لوله مشخص و مساحت کل آن محاسبه شد و سپس با استفاده مجدد از گزینه ROI حدود لومن نیز مشخص و مساحت آن اندازه‌گیری شد و سپس با کسر مساحت لومن از مساحت کل سطح مقطع، مساحت اپیتلیوم زایشی به‌دست آمد. میانگین مساحت سطح مقطع لوله‌های اسپرم‌ساز و مساحت اپیتلیوم زایشی به میکرومتر مربع برای تمام گروه‌ها محاسبه و گزارش شد(11،18،27). ارزیابی اسپرماتوژنز بر اساس شاخص درجه‌بندی جانسون انجام شد. این شاخص یک مقیاس ارزیابی بر اساس وضعیت مورفولوژیک لوله‌های اسپرم‌ساز است که با استفاده از آن می‌توان به هر لوله اسپرم‌ساز نمره ای بین 1 (بدترین حالت) تا 10 (اسپرماتوژنز کامل و توبول‌های بی نقص) داد. به‌طور خلاصه اگر در لام بافت‌شناسی اپیتلیوم سازنده لوله‌های اسپرم‌ساز وجود نداشته باشد یا منقطع باشد اسکور 1 در نظر گرفته می‌شود، اگر اپیتلیوم سازنده لوله‌ها وجود داشته باشند اما درون آن‌ها فقط سلول‌های سرتولی مشاهده شوند اسکور2، در صورت وجود فقط سلول‌های سرتولی+ اسپرماتوگونی اسکور3، وجود سلول‌های سرتولی+ اسپرماتوگونی+تعداد کم اسپرماتوسیت اسکور4، وجود سلول‌های سرتولی+ اسپرماتوگونی +تعداد زیاد اسپرماتوسیت اسکور 5، موارد اسکور قبل+ تعداد کم اسپرماتیدهای اولیه اسکور6، موارد اسکور قبل+ تعداد زیادی اسپرماتیدهای اولیه اسکور7، موارد قبلی+ وجود کم‌تر از 5 اسپرماتوزوآ در لومن اسکور8، درصورتی که تمام رده‌های سلولی دودمان جنسی وجود داشته باشند اما آسیب اندکی نظیر بی‌نظمی ساختاری (اعوجاج، ضایعات حباب مانند و...) وجود داشته باشد اسکور 9 و همان‌طور که در ابتدا گفته شد در صورتی که اسپرماتوژنز کامل بود ونقضی در لوله مشاهده نشد رتبه 10 اختصاص داده خواهد شد(11،19).

روش تجزیه و تحلیل: داده‌های به‌دست آمده از اندازه‌گیری‌های مورفولوژیک، بیوشیمیایی و بافت‌شناسی وارد نرم‌افزار آماری SPSS (ویرایش 18) شدند. ابتدا توزیع داده‌ها با کمک آزمون شاپیرو- ویلک انجام شد. جهت مقایسه متغیرهای دارای توزیع نرمال (قندخون، وزن، متغیرهای اسپرم و تستوسترون) در بین گروه‌ها از آزمون آماری ANOVA و تست تعقیبی Tukey و جهت مقایسه متغیرهای دارای توزیع غیر نرمال (مساحت لوله‌های اسپرم‌ساز و مساحت اپیتلیوم زایشی) بین گروه‌های مورد مطالعه از آزمون ناپارمتری Kruskal-Wallis H test و در صورت معنی‌دار بودن آزمون مذکور از تست ناپارامتری Mann-Whitney U test استفاده شد. اختلافات در سطح $P< 0/05$ معنی‌دار تلقی شدند.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

یافته‌ها

نتایج قندخون، غلظت تستوسترون و پراکسیداسیون لیپیدی گروه‌های مورد مطالعه در جدول شماره 1 ارائه شده است.

جدول شماره 1: مقایسه میانگین سطح پلاسمایی قندخون، تستوسترون و غلظت بافتی مالون دی آلدهید در گروه های مورد مطالعه

متغیر / گروه	قند خون ناشتا (میلی گرم بر دسی لیتر)	تستوسترون (نانوگرم بر میلی لیتر)	مالون دی آلدهید (نانومول/میلی گرم پروتئین)
کنترل	106/00±14/89	1/80±0/17	22/12±1/88
مدل دیابتی	*417/75 ±45/44	*0/09±0/02	* 54/75±3/61
مت فورمین	*#216/25±30/41	*#0/47±0/06	*#33/25±2/12
عصاره 150	†*#441/12±50/75	†*#0/24±0/02	†*#41/75±2/91
عصاره 300	†*375/37±33/32	†*#0/86±0/11	*#33/62 ±2/38
متفورمین +عصاره150	*#234/00±24/05	†*#0/72±0/12	† *#28/00±1/77
متفورمین +عصاره300	*#212/50 ±24/29	†*#1/2±0/10	† #23/75 ±1/98

مقادیر به‌صورت انحراف معیار± میانگین برای هر گروه(n=8) ارائه شده است.
مقایسه بین گروهی با آزمون واریانس یکطرفه و پس آزمون توکی انجام شد.
* تفاوت معنی‌دار (P <0/05) در مقایسه با گروه کنترل؛
# تفاوت معنی دار(P <0/05) در مقایسه با گروه مدل دیابتی؛
† تفاوت معنی دار(P <0/05) در مقایسه با گروه مت فورمین

قندخون موش‌های دیابتی به‌طور معنی‌داری (حدود 4 برابر) بیش‌تر از موش‌های سالم بود(P<0/001). تیمار موش‌های دیابتی با داروی مت‌فورمین سبب کاهش معنی‌دار سطح قندخون آن‌ها در مقایسه با موش‌های دیابتی گروه مدل شده بود(P< 0/001) اما هم‌چنان به‌طور معنی‌داری بیش‌تر ازگروه کنترل سالم بود. به عبارت دیگر، مت‌فورمین قندخون موش‌های دیابتی را کاهش داده بود اما نتوانسته بود در مدت زمان مطالعه سطح آن را به مقادیر طبیعی بازگرداند. تیمار موش‌های دیابتی با عصاره اکلیل‌الملک نتیجه کاهنده قندخونی را در بر نداشت و قندخون ناشتا در هر دو گروه دریافت‌کننده عصاره با دوزهای 300mg/kg و 150mg/kg با موش‌های گروه مدل دیابتی تفاوت معنی‌داری نداشت. اگرچه دوز 300mg/kg عصاره اکلیل‌الملک قندخون را در موش‌ها اندکی کاهش داده بود اما این کاهش از نظرآماری معنی‌دار نبود. مقایسه قندخون گروه دریافت‌کننده مت‌فورمین با گروه‌های دریافت‌کننده ترکیب مت‌فورمین و عصاره (هر دو دوز) تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. به عبارت دیگر تداخل مثبت و یا منفی بین مت فورمین و عصاره اکلیل‌الملک در پارامتر قندخون مشاهده نشد.

اندازه گیری سطح سرمی هورمون تستوسترون نشان داد که در موش‌های دیابتی سطح این هورمون بطور قابل توجهی (P<0/001) در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش پیدا کرده بود. موش‌های دیابتی تیمارشده با مت‌فورمین به‌طور معنی‌داری سطح تستوسترون بالاتری در مقایسه با گروه مدل داشتند(P<0/001)، با این حال همچنان سطح تستوسترون در این گروه حدود 4 برابر کم‌تر از سطح نرمال بود(P<0/001). مصرف عصاره الکلی اکلیل‌الملک در یک اثر وابسته به دوز سبب افزایش معنی‌دار سطح تستوسترون در موش‌های دیابتی شده بود. سطح تستوسترون در گروه دریافت‌کننده دوز 300 mg/kg عصاره به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه مت‌فورمین و همچنین گروه دریافت‌کننده دوز 150 mg/kg عصاره بود(P<0/05). ترکیب مت فورمین با عصاره در هر دو دوز اثر هم افزایی را در پارامتر تستوسترون نشان داد به صورتی که سطوح تستوسترون در گروه‌های دریافت‌کننده دوز همزمان مت‌فورمین با عصاره به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه‌های متناظر دریافت‌کننده عصاره و همچنین دریافت‌کننده مت فورمین به تنهایی بودند.

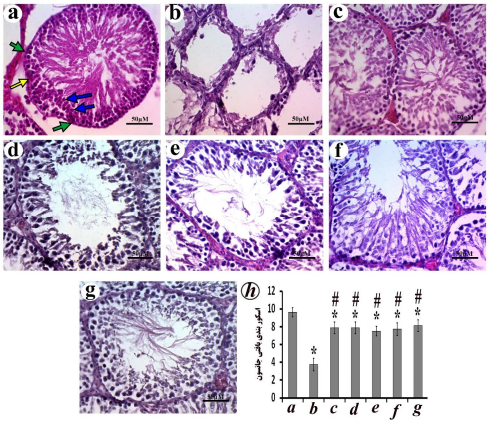
اندازه‌گیری MDA به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در بافت بیضه موش‌های مورد مطالعه نشان داد که سطح MDA در گروه مدل دیابتی به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه کنترل بود(P <0/001). تیمار موش‌های دیابتی با مت‌فورمین سبب کاهش معنی‌دار سطح MDA در بافت بیضه آن‌ها شده بود، اما همچنان در مقایسه با موش‌های نرمال شاخص پراکسیداسیون لیپیدی بالاتری را داشتند. عصاره اکلیل‌الملک در اثری مشابه مت‌فورمین سبب کاهش معنی‌دار سطح MDA در موش‌های دیابتی شد. ترکیب مت فورمین با عصاره در هر دو دوز اثر هم افزایی را در پارامتر MDA نشان داد به صورتی که سطح MDA درگروه‌های دریافت‌کننده دوز همزمان مت‌فورمین

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

با عصاره، به‌طور معنی‌داری کم‌تر از گروه‌های متناظر دریافت‌کننده عصاره و همچنین دریافت‌کننده مت‌فورمین به تنهایی بود. سطح MDA در گروه دریافت‌کننده همزمان مت‌فورمین و عصاره با دوز 300mg/kg تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نرمال نداشت. سیمای بافت شناسی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه‌های مختلف در تصویر شماره 1 ارائه شده است. در گروه کنترل لوله‌های اسپرم‌ساز ساختار طبیعی داشتند و در آن‌ها سلول‌های دودمان جنسی به‌طور منظم حضور داشته و اسپرماتوژنز کامل بود اما در گروه مدل دیابتی مساحت لوله‌های اسپرم‌ساز به‌طور قابل توجهی کوچک‌تر و اپیتلیوم‌زایشی آن‌ها دچار تغییرات تحلیل رونده شده بود، به‌صورتی‌که در این گروه اسپرماتوزوآ، اسپرماتید و اسپرماتوسیت در لوله‌های اسپرم‌ساز قابل مشاهده نبود. از جمله دیگر تغییرات مشاهده شده در گروه مدل دیابت می‌توان به نابسامانی تیغه پایه اپیتلیوم، تعداد کم اسپرماتوگونی‌ها و همچنین واکوئوله شدن اپیتلیوم‌زایشی در برخی از توبول‌ها اشاره نمود. گروه‌های دریافت‌کننده مت‌فورمین و عصاره چه به‌صورت جداگانه و چه به‌صورت مصرف همزمان، سیمای بافت شناسی بهتری را در قیاس با گروه مدل دیابتی از خود نشان دادند. از نظر اسپرماتوژنز ضریب جانسون در تمام گروه‌های مداخله به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه مدل دیابتی بود اما همچنان با وضعیت نرمال از نظر آماری تفاوت داشت (تصویر شماره1).

جهت تبیین تفاوت‌های ساختاری، لوله‌های اسپرم‌ساز مورد ارزیابی کمی قرار گرفتند. پارامترهای مساحت سطح مقطع لوله‌ها، مساحت اپیتلیوم زایشی و هم‌چنین میانگین نسبت مساحت اپیتلیوم زایشی به مساحت کل سطح مقطع لوله مورد ازیابی قرار گرفت که نتایج آن در جدول شماره 2 ارائه شده است.

بر این اساس در گروه مدل دیابتی مساحت کل لوله‌ها، مساحت اپیتلیوم زایشی و همچنین نسبت اپیتلیوم زایشی به مساحت کل لوله به‌طور معنی‌داری در قیاس با گروه کنترل کاهش پیدا کرده بود($P<0/001$). در مقایسه با



تصویر شماره 1: نمای میکروسکوپی از بافت بیضه (لوله‌های اسپرم‌ساز) در گروه‌های کنترل (a)، مدل دیابتی (b)، دیابتی تیمار شده با دوز 500 mg/kg مت فورمین (c)، دیابتی تیمار شده با عصاره الکلی اکلیل الملک در دوزهای 150mg/kg (d) و 300mg/kg (e) و همچنین موش‌های دیابتی که با ترکیب عصاره- مت فورمین در دوزهای 150 mg/kg (f) و 300 mg/kg (g) تیمار شدند. بزرگنمایی 400 برابر، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، نوار نشانه=50 میکرومتر. در گروه کنترل، فلش سبز اسپرماتوگونی؛ فلش آبی اسپرماتوسیت و فلش زرد سلول سرتولی را نشان می‌دهد و اسپرماتوزوئیدها در مرکز لومن به فراوانی مشاهده می‌شوند. درجه‌بندی جانسون (h) ارزیابی وضعیت اسپرماتوژنز را نشان می‌دهد.

* تفاوت معنی‌دار ($P<0/05$) در مقایسه با گروه کنترل؛

تفاوت معنی‌دار ($P<0/05$) در مقایسه با گروه مدل دیابتی

جدول شماره 2: مقایسه میانگین پارامترهای وزن بیضه، مساحت لوله‌های اسپرم ساز، مساحت اپیتلیوم زایشی و نسبت اپیتلیوم زایشی به مساحت لوله‌ها در گروه‌های مورد مطالعه

متغیر / گروه	وزن بیضه (گرم)	مساحت لوله ها (میکرومترمربع ×1000)	مساحت اپیتلیوم زایشی (میکرومترمربع ×1000)	نسبت اپیتلیوم زایشی به مساحت لوله‌ها (درصد)
کنترل	1/92±0/13	67/38±6/82	52/83±5/14	78/75±7/26
مدل دیابتی	0/57±0/07*†	11/54±0/31*†	5/24±0/51*†	45/41±4/22*†
مت فورمین	1/03±0/12*#	28/72±1/10*#	17/60±1/3*#	61/30±4/64*#
عصاره 150	1/04±0/10*#	22/49±2/78 *†	13/25±2/15*†	58/75±4/38*#
عصاره 300	1/17±0/13*#	41/13±6/07#†	25/48±5/3 #†	62/13±9/52*#
متفورمین+عصاره150	1/08±0/12*#	30/55±4/51 *#	20/81±1/48*#	68/94±6/48*#
متفورمین+عصاره300	1/50±0/07*#†	41/64±1/07#†	29/22±1/53#†	70/23±2/72 #†

مقادیر به‌صورت انحراف معیار± میانگین برای هر گروه (n=8) ارائه شده است. مقایسه بین گروهی با آزمون غیرپارامتری کروسکال والیس (مساحت لوله‌ها و مساحت اپیتلیوم زایشی) و واریانس یکطرفه و پس آزمون توکی انجام شد(وزن بیضه و نسبت اپیتلیوم زایشی به مساحت کل لوله).

* تفاوت معنی‌دار ($P<0/05$) در مقایسه با گروه کنترل؛

تفاوت معنی‌دار ($P<0/05$) در مقایسه با گروه مدل دیابتی؛

† تفاوت معنی‌دار ($P<0/05$) در مقایسه با گروه مت فورمین.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

گروه مدل دیابتی، تمامی مداخلات توانسته بودند سبب افزایش معنی‌دار پارامترهای یاد شده در موش‌های دیابتی شوند. گروه دریافت‌کننده ترکیب مت‌فورمین با دوز 300mg/kg عصاره، شاخص‌های بافتی مشابه گروه کنترل و در سطح نرمال داشت. عصاره به خصوص در دوز 300mg/kg توانسته بود به‌طور معنی‌داری اثرات سودمند مت‌فورمین بر بافت بیضه موش‌های دیابتی را ارتقا دهد. هم راستا با تغییرات بافت‌شناسی مقایسه میانگین وزن بیضه در موش‌ها نیز نشان داد که وزن بیضه در موش‌های دیابتی به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش یافته بود (P<0/001). تمامی مداخلات به‌طور معنی‌داری از کاهش وزن بیضه در موش‌های دیابتی جلوگیری کردند، اما وزن بیضه در هیچ یک از گروه‌های مداخله به اندازه مقادیر نرمال نبود.

نتایج بررسی پارامترهای اسپرمی در جدول شماره 3 ارائه شده است. تعداد، قابلیت حیات و درصد اسپرم‌های متحرک در گروه مدل دیابتی به‌طور معنی‌داری کم‌تر از گروه کنترل بود. در گروه دریافت‌کننده مت‌فورمین تعداد اسپرم‌ها، تحرک و قابلیت حیات آن‌ها به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه مدل بود اما همچنان با مقادیر نرمال از نظر آماری تفاوت داشت. عصاره اکلیل‌الملک در یک اثر وابسته به دوز سبب افزایش معنی‌دار در تعداد اسپرم‌ها، قابلیت حیات و تحرک اسپرم‌ها شده بود اما این اثرات در مقایسه با گروه دریافت‌کننده مت‌فورمین معنی‌دار نبود. حتی در گروه دریافت‌کننده دوز mg/kg 150 عصاره تعداد اسپرم‌ها و درصد اسپرم‌های متحرک به‌طور معنی‌داری کم تر از مقادیر متناظر در گروه مت فورمین بود. مصرف همزمان عصاره اکلیل‌الملک با مت فورمین اگرچه سبب ارتقای پارامترهای اسپرمی در مقایسه با گروه مدل دیابتی شده بود، اما در مقایسه با گروه دریافت‌کننده مت فورمین این اثرات تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. به عبارت دیگر عصاره اثر هم‌افزایی را با مت فورمین در خصوص پارامترهای اسپرمی نشان نداد.

جدول شماره 3: مقایسه میانگین پارامترهای اسپرمی در گروه های مورد مطالعه

متغیر / گروه	تعداد اسپرم ($\times 10^7$/mL)	قابلیت حیات اسپرم (%)	تحرک اسپرم (%)
کنترل	18/21±1/06	81/87±8/20	8/37±2/82
مدل دیابتی	*6/75±1/03	*43/50±5/78	*44/00±3/74
مت فورمین	#*14/25±1/66	#*65/62±9/79	#*61/50±7/89
عصاره 150	#†*12/13±1/54	#*56/12±6/33	#*†42/37±6/06
عصاره 300	#*13/25±1/38	#*61/75±4/55	#*54/25±5/49
متفورمین+عصاره150	#*14/37±1/06	#*63/25±6/40	#*59/87±4/45
متفورمین+عصاره300	#*15/62±1/87	#*68/00±4/14	#*65/00±5/20

مقادیر به‌صورت انحراف‌معیار±میانگین برای هر گروه (n=8) ارائه شده است.
مقایسه بین گروهی با آزمون واریانس یکطرفه و پس آزمون توکی انجام شد.
* تفاوت معنی دار(P <0/05) در مقایسه با گروه کنترل؛
# تفاوت معنی دار(P <0/05) در مقایسه با گروه مدل دیابتی؛
† تفاوت معنی دار(P <0/05) در مقایسه با گروه مت فورمین.

بحث

این پژوهش با هدف بررسی اثرات مصرف همزمان عصاره الکلی اکلیل‌الملک با مت‌فورمین درکنترل عوارض دیابت بر روی عملکرد دستگاه تولید مثل در موش‌های صحرایی نر اجرا گردید. در این مطالعه موش‌های دیابتی به‌مدت 28 روز با دوزهای مختلف عصاره(150 و 300 mg/kg) و مت‌فورمین (500 mg/kg) به‌صورت جداگانه و یا ترکیبی روزانه یک نوبت به‌صورت خوراکی تیمار شدند. در پایان مطالعه یافته‌ها نشان داد، القای دیابت سبب آسیب به دستگاه تولید مثل موش‌ها در سطوح مختلف مورفولوژیک و عملکردی شده بود. به نظر می‌رسد یکی از مکانیسم‌های ایجادکننده آسیب از طریق افزایش فعالیت‌های استرس اکسیداتیو بوده باشد، چنان‌که شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در بیضه موش‌های دیابتی به‌طور چشمگیری (حدود 2 برابر) در قیاس با گروه کنترل افزایش یافته بود. مهم‌ترین یافته‌های این مطالعه نشان دادند که عصاره اکلیل الملک در دوزهای استفاده شده در این مطالعه نتوانست سبب کاهش قندخون در موش‌های دیابتی شود. با این حال تیمار موش‌های دیابتی با عصاره اکلیل‌الملک سبب کاهش معنی‌دار پراکسیداسیون لیپیدی، افزایش غلظت تستوسترون، بهبود پارامترهای اسپرمی و پارامترهای

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

مورفولوژیک بیضه شد. در مقام مقایسه به‌جز در پارامتر غلظت تستوسترون، در بقیه پارامترهای مورد مطالعه اثرات مت‌فورمین بهتر و یا برابر با عصاره اکلیل‌الملک بود. عصاره اکلیل‌الملک در دوز 300 mg/kg به‌طور قابل توجهی سطح تستوسترون را در موش‌ها افزایش داد که در مقایسه با گروه تیمار شده با مت‌فورمین این افزایش بیش از دو برابر بود. در مصرف همزمان مت‌فورمین با عصاره اکلیل‌الملک، شواهدی مبنی بر بهبود نسبی شاخص‌های مورد مطالعه به‌دست آمد که مهم‌ترین آن‌ها افزایش سطح تستوسترون، کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، و بهبود پارامترهای مورفولوژیک بیضه بود. مصرف همزمان عصاره با مت فورمین تاثیری بر بهبود کیفیت پارامترهای اسپرمی در قیاس با گروه دریافت‌کننده مت فورمین (به تنهایی) نداشت.

در این مطالعه از مدل حیوانی القای دیابت توسط ماده استرپتوزوتوسین استفاده شد. این مدل یکی از رایج‌ترین مدل‌های حیوانی دیابت نوع یک محسوب می‌شود. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که تزریق استرپتوزوتوسین در سه هفته اول سبب ایجاد آسیب‌های بافتی از جمله القای آپوپتوز، از دست رفتن نسبی اپیتلیوم زایشی، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و...در بیضه می‌شود اما این آسیب‌ها بیش‌تر از آن‌که به‌دلیل شرایط هایپرگلایسمی باشد به‌دلیل اثرات سمی استرپتوزوتوسین است. از این رو پیشنهاد شده است که جهت ایجاد یک مدل شبیه‌تر به آن‌چه در شرایط دیابت در بدن انسان اتفاق می‌افتد در سه هفته نخست بدنبال تزریق استرپتوزوتوسین مداخلات شروع نشوند و حداقل 4 هفته حیوانات در شرایط هایپرگلایسمی نگهداری شوند، تا ضمن ایجاد عوارض ثانویه دیابت در آن‌ها، آسیب‌های اولیه ناشی از سمیت استرپتوزوتوسین (و نه هیپرگلایسمی) حذف شود(28،27). بنابراین در مطالعه حاضر موش‌ها پس از القای دیابت به‌مدت چهار هفته بدون تیمار نگهداری شدند و طول مدت تیمار نیز چهار هفته انتخاب شد تا حداقل 8 هفته حیوانات در شرایط دیابتیک قرار گیرند.

یافته‌های این مطالعه نشان داد که عصاره اکلیل الملک نتوانست سبب کاهش قندخون در موش‌های دیابتی شود در حالی که مت‌فورمین حدود 50 درصد قندخون را در موش‌های دیابتی کاهش داده بود. تا کنون مطالعه‌ای به بررسی اثرات آنتی دیابتیک اکلیل الملک نپرداخته است و در مطالعه حاضر برای نخستین بار این ارزیابی انجام شد. هم‌راستا با یافته‌های این پژوهش، مطالعات تجربی متعددی وجود دارند که نشان می‌دهند مت‌فورمین می‌تواند سبب کاهش قندخون در موش‌های دیابتی شده توسط استرپتوتوسین شود(3،13،14،27).

در مدل‌های دیابت القا شده با استرپتوزوتوسین، اختلال در عملکرد سیستم تولید مثلی نر با افزایش فعالیت استرس اکسیداتیو در بافت بیضه و اپیدیدیم مشاهده می‌شود(35). دیابت ایجاد شده در مدل های حیوانی می‌تواند منجر به آسیب دستگاه تولید مثلی جنس نر با کاهش وزن ارگان‌های جنسی، اپیدیدیم، کاهش تحرک اسپرم‌ها و کاهش تولید هورمون‌های جنسی شود. در مطالعات متعدد، مصرف داروی مت‌فورمین علاوه بر کاهش قند خون سبب بهبود عملکرد دستگاه تولیدمثلی نر گردیده است. مت‌فورمین با کاهش استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز دربیضه‌ها سبب بهبود عملکرد دستگاه تناسلی شده و با افزایش سطح تستوسترون و تحریک اسپرماتوژنز و افزایش تحرک اسپرم‌ها عوارض دیابت بر دستگاه تناسلی را کاهش داده است(36). مطالعاتی نیز وجود دارند که نشان می‌دهند برخی داروها و یا عصاره‌های گیاهی بدون داشتن اثرکاهنده قندخون از طریق مهار آسیب‌های استرس اکسیداتیو وکاهش التهاب می‌توانند سبب پیشگیری و یا تعدیل آسیب‌های دستگاه تولیدمثلی در موش‌های دیابتی شوند(37،27). همان‌طور که پیش‌تر در مقدمه عنوان شد گیاه اکلیل‌الملک با دارابودن خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهاب در درمان بیماری‌های روماتیسمی، سردرد، مشکلات گوارشی، سنگ کلیه و... استفاده می‌شده است(۲۱،۱۷،۱۶). اما تا کنون هیچ مطالعه‌ای تاثیر آن بر دیابت و سیستم تولید

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

مثلی در بیماران و مدل‌های حیوانی دیابت را بررسی نکرده است. در مطالعه‌ای که در سال 2008 توسط Krasteva و همکارانش انجام شد اثرآنتی پرولیفراتیو فلاونوئیدهای Glycoside rhamnocitrin 4'-βD-galactopyranoside (RGP) و مخلوط اسپانین‌های 1و2 که از گیاه Astragalus hamosus L به‌دست آمده بود و بر رده‌های مختلف توموری همچون Acute myeloid leukemia (HL-60)، T-cell leukemia SKW-3 و رده‌های سلولی مالتیپل میلوما (RPMI-8226, U-266,OPM-2) بررسی شد. در این مطالعه از تست MTT و کیت تشخیص آپوپتوز به روش الایزا استفاده شد و نتایج حاصل از آن نشان داد فلاونوئیدهای گیاه اکلیل الملک با دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی توانستند با بهبود عملکرد سیستم ایمنی و مهار آنژیوژنز، پرولیفراسیون در سلول‌های توموری را کاهش دهند(38). در مطالعه حاضر نیز عصاره الکلی اکلیل الملک توانست پراکسیداسیون لیپیدی، غلظت تستوسترون و پارامترهای اسپرمی در موش‌های دیابتی را بهبود بخشد که این اثرات را می‌توان منتسب به ترکیبات موجود در این گیاه دانست که خواص آنتی‌اکسیدانی دارند. Saleem و همکاران در سال 2013 نیز اثر فلاونوئید RGP به‌دست آمده از برگ گیاه اکلیل الملک (Astragalus hamosus L) را بر سرطان کبد القا شده با ان دی‌اتیل نیتروزآمین در رت‌های نژاد ویستار بررسی کردند. یافته‌های آن‌ها نشان داد که RGP در یک اثر وابسته به دوز توانست با کاهش آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز، بیلی‌روبین توتال، افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و بهبود پراکسیداسیون لیپیدی در درمان سرطان کبد موثر باشد(39). خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی اکلیل‌الملک می‌تواند ناشی از حضور اسیدهای چرب موجود در آن باشد، چنان‌چه مطالعات گذشته نشان داده‌اند که چربی‌های غیراشباع بلند زنجیر با داشتن خواص ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی می‌توانند رشد سلول‌های سرطانی را مهار کنند(40) و از طرفی شواهد علمی وجود دارند که نشان می‌دهند روغن‌های حاوی مقادیر بالای PUFA می‌توانند در بهبود شاخص‌های باروری جنس مذکر اثرگذار باشند(41). مطالعه فیتوشیمی دانه‌های اکلیل‌الملک نشان داده است که حدود 80 درصد روغن این گیاه از نوع PUFA بوده و اسیدهای چرب لینولئیک اسید (48 درصد)، لینولنیک اسید (25 درصد) و لوریک اسید (8 درصد) فراوان‌ترین اسیدهای چرب شناسایی شده در این گیاه هستند(17). همان‌طور که در مقدمه نیز اشاره شد اکلیل‌الملک درشرایط In vitro خاصیت آنتی‌اکسیدانی (مهار پراکسیداسیون لیپیدی) بیش‌تر از ترکیباتی چون ترولکس و کوئرستین را نشان داده بود(24).

یکی دیگر از خواص اکلیل‌الملک که احتمالا از طریق آن می‌تواند اثرات سودمند خود را بر عملکرد دستگاه تولید مثل اعمال نماید خاصیت ضد التهابی است. در مطالعه‌ای که در سال 2010 توسط Hakim و همکاران انجام گرفت اثر عصاره الکلی و آبی اکلیل‌الملک بر التهاب حاد ناشی از تزریق کاراگینان در پنجه پای موش‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه یک گروه از موش‌ها دوز استاندارد داروی پیروکسیکام با غلظت 2/8 mg/kg دریافت کردند و دو گروه دیگر هر کدام به ترتیب با دوز 0/58 g/kg از عصاره الکلی و آبی اکلیل‌الملک تیمار شدند. یک ساعت بعد از مصرف عصاره و دارو با تزریق کاراگینین التهاب در پنجه پای راست موش‌ها القا گردید و بعد از گذشت سه ساعت یافته‌ها نشان داد هر دو عصاره آبی و الکلی اکلیل‌الملک توانستند التهاب ایجادشده در پنجه موش‌ها را بهبود بخشند. در این مطالعه اگرچه اثر داروی پیروکسیکام بهتر از عصاره‌ها بود اما تفاوت معناداری بین اثر بخشی عصاره‌های آبی و الکلی مشاهده نگردید. یافته‌های این مطالعه نشان داد اکلیل‌الملک می‌تواند درد را تکسین داده و با مهار سنتز پروستاگلندین‌ها، ادم ناشی از التهاب حاد را کاهش دهد(21). در مطالعه دیگری شجاعی و همکاران نیز گزارش کردند که اثر ضد التهابی بلند مدت عصاره الکلی اکلیل‌الملک در دوزهای 100- 300mg/kg

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

معادل سدیم سالیسیلات است(22).

ما در این مطالعه برای اولین بار به بررسی خواص آنتی دیابتیک این گیاه و اثر آن بر دستگاه تولید مثلی موش‌های نر دیابتی پرداختیم. یافته‌های این مطالعه نشان داد که این عصاره اثر کاهنده قندخون ندارد و مصرف همزمان آن با داروی مت‌فورمین نیز اختلالی در اثرات هیپوگلایسمیک این دارو ایجاد نمی‌کند. به‌نظر می‌رسد گیاه اکلیل‌الملک اگرچه نتوانست قندخون را در موش‌های دیابتی کاهش دهد اما از طریق مهار پراکسیداسیون لیپیدی و احتمالا التهاب قادر است آسیب باروری ناشی از هایپر گلایسمی را در موش‌های دیابتی تعدیل کند.

یکی از محدودیت‌های این مطالعه عدم ارزیابی اثرات عصاره اکلیلالملک بر پارامترهای تولید مثلی موش‌های سالم می‌باشد که با توجه به این‌که این گیاه اثرات هیپوگلایسمیک و سمیت خوراکی ندارد می‌توان در تحقیقات آینده بر روی موش‌های سالم به‌خصوص موش‌های سالم پیر نیز مورد بررسی قرارگیرد. همچنین بهتر است در مطالعات آینده ارزیابی مواد موثره موجود در عصاره این گیاه نیز با روش‌های گیاه شیمی انجام شود.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر حاصل بخشی از یافته‌های طرح تحقیقاتی مصوب (455161) دانشگاه علوم پزشکی بیرجند می‌باشد. از آقای محمد یاسین قائمی که در اجرای مطالعه حیوانی به ما کمک کردند تشکر می‌کنیم.

References

1. Lin X, Xu Y, Pan X, Xu J, Ding Y, Sun X, et al. Global, regional, and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories: an analysis from 1990 to 2025. Sci Rep 2020; 10(1): 14790.
2. Khamseh ME, Sepanlou SG, Hashemi-Madani N, Joukar F, Mehrparvar AH, Faramarzi E, et al. Nationwide Prevalence of Diabetes and Prediabetes and Associated Risk Factors Among Iranian Adults: Analysis of Data from PERSIAN Cohort Study. Diabetes Ther 2021; 12(11): 2921-2938.
3. Hassanzadeh-Taheri M, Hosseini M, Hassanpour-Fard M,Ghiravani Z,Vazifeshenas-Darmiyan K, Yousefi S, et al. Effect of turnip leaf and root extracts on renal function in diabetic rats. Orient Pharm Exp Med 2016; 16(4): 279-286.
4. Iacobini C, Vitale M, Pesce C, Pugliese G, Menini S. Diabetic Complications and Oxidative Stress: A 20-Year Voyage Back in Time and Back to the Future. Antioxidants 2021; 10(5): 727.
5. Ghiravani Z, Zardast M, Hassanpour-Fard M, Hosseini M. Effects of hydro alcoholic extract of internal septum of walnut on diabetic nephropathy in rats. J Birjand Univ Med Sci 2015; 22 (2) :104-114.
6. Zarezadeh M, Vazifeshenas-Darmiyan K, Afshar M, Valavi M, Serki E, Hosseini M. Effects of extract of Crocus sativus petal on renal function in diabetic rats . J Mazand Univ Med Sci 2017; 27(147): 11-24.
7. Vazifeshenas-Darmiyan K, Hosseini M, Rezaei R, Ezi S, Malekaneh M. The Effects of Aqueous Extract of Wild Pistachio (Pistacia Atlantica) leaves on Diabetic Nephropathy in Rat. Armaghane Danesh 2016; 21(5): 420-434.
8. Tavares RS, Escada-Rebelo S, Silva AF, Sousa MI, Ramalho-Santos J, Amaral S. Antidiabetic therapies and male reproductive function: where do we stand? Reproduction 2018; 155(1): R13-R37.
9. Barkabi-Zanjani S, Ghorbanzadeh V, Aslani M, Ghalibafsabbaghi A, Chodari L. Diabetes

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

mellitus and the impairment of male reproductive function: Possible signaling pathways. Diabetes Metab Syndr 2020; 14(5): 1307-1314.

10. Maresch CC, Stute DC, Alves MG, Oliveira PF, de Kretser DM, Linn T. Diabetes-induced hyperglycemia impairs male reproductive function: a systematic review. Hum Reprod Update 2018;24(1):86-105.
11. Mesbahzadeh B, Hassanzadeh-Taheri M, Aliparast MS, Baniasadi P, Hosseini M. The protective effect of crocin on cisplatin-induced testicular impairment in rats. BMC Urol 2021; 21(1): 117.
12. Alzahrani AS, Price MJ, Greenfield SM, Paudyal V. Global prevalence and types of complementary and alternative medicines use amongst adults with diabetes: systematic review and meta-analysis. Eur J Clin Pharmacol 2021; 77(9): 1259-1274.
13. Hassanzadeh-Taheri M, Hassanpour-Fard M , Doostabadi M, Moodi H, Vazifeshenas-Darmiyan K, Hosseini M. Co-administration effects of aqueous extract of turnip leaf and metformin in diabetic rats. J Tradit Complement Med 2018; 8(1): 178-183.
14. Hassanzadeh-Taheri M, Salimi M, Vazifeshenas-Darmiyan K, Mohammadifard M, Hosseini M. Investigating the effect of ethanolic extract of Commiphora myrrha (Nees) Engl. gum-resin against hepatorenal injury in diabetic rats. J Diabetes Metab Disord 2021; 20(2): 1573-1581.
15. Amiri MS, Joharchi MR, Taghavizadehyazdi ME. Ethno-medicinal plants used to cure jaundice by traditional healers of mashhad, iran. Iran J Pharm Res 2014; 13(1): 157-162.
16. Hassanzadeh-Taheri M, Hosseini M, Salimi M, Moodi H, Dorranpour D. Acute and Sub-Acute Oral Toxicity Evaluation of Astragalus hamosus Seedpod Ethanolic Extract in Wistar Rats. Pharm Sci 2018; 24(1): 23-30.
17. Hamedi A, Zarshenas MM, Sohrabpour M. Phytochemical assessments of Astragalus hamosus pods(Iklil-ul-Malik). Trends Pharmacol Sci 2016; 2(1): 77-81.
18. Ezi S, Hosseini M, Hassanzadeh-Taheri M, Jahani F, Afshar M, Hassanzadeh-Taheri M. Effects of Tail fat enriched diet on male Wistar rat reproductive system. J Birjand Univ Med Sci 2016; 23(1): 1-10.
19. Hassanzadeh-Taheri M,Jahani F, Hassanzadeh-Taheri M, Doostabadi M, Doostabadi H, Hosseini M. The impacts of yoghurt butter oil on rat testicular morphology and sexual hormones in a 150-day study. Comp Clin Path 2018; 27(4): 959-965.
20. Van Tran L, Malla BA, Kumar S, Tyagi AK. Polyunsaturated Fatty Acids in Male Ruminant Reproduction-A Review. Asian-Australasian J Anim Sci 2017; 30(5): 622-637.
21. Hakim A, Ghufran A, Nasreen J. Evaluation of anti-inflammatory activity of the pods of Iklil-ul-Malik (Astragalus hamosus Linn.). Indian J Nat Prod Resour 2010; 1(1): 34-37.
22. Shojaii A, Motaghinejad M, Norouzi S, Motevalian M. Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activity of the extract and fractions of Astragalus hamosus in animal models. Iran J Pharm Res 2015; 14(1): 263-269.
23. Saleem S, Shaharyar MA, Khusroo MJ, Ahmad P, Rahman RU, Ahmad K, et al. Anticancer potential of rhamnocitrin 4'-β-D-galactopyranoside against N-diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. Mol Cell Biochem 2013; 384(1-2): 147-153.
24. Souri E, AMIN GR, Jalalizadeh H, Barezi S. Screening of thirteen medicinal plant extracts

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

for antioxidant activity. Iran J Pharm Res 2008; 7(2): 149-154.

25. Honari N, Shaban P, Nasseri S, Hosseini M. Ethanolic extract of Achillea wilhelmsii C. Koch improves pulmonary function and inflammation in LPS-induced acute lung injury mice. J Complement Integr Med 2021; Online ahead of print.
26. Kiani Z, Hassanpour-Fard M, Asghari Z, Hosseini M. Experimental evaluation of a polyherbal formulation (Tetraherbs): antidiabetic efficacy in rats. Comp Clin Path 2018; 27(6): 1437-1445.
27. Hassanzadeh_Taheri M, Hosseini M, Dorranipour D, Afshar M, Moodi H, Salimi M. The oleo-gum-resin of Commiphora myrrha ameliorates male reproductive dysfunctions in streptozotocin-induced hyperglycemic rats. Pharm Sci 2019; 25(4): 294-302.
28. Hassanzadeh-Taheri M, Hosseini M. Comments on" The improvement effects of Gordoniabronchialis on male fertility of rats with diabetes mellitus induced by Streptozotocin. Pharm Sci 2020; 26(1): 93-95.
29. Bahaeddin Z, Yans A, Khodagholi F, Sahranavard S. Dietary supplementation with Allium hirtifolium and/or Astragalus hamosus improved memory and reduced neuro-inflammation in the rat model of Alzheimer's disease. Appl Physiol Nutr Metab 2018; 43(6): 558-564.
30. Ghiravani Z, Hosseini M, Taheri MMH, Fard MH, Abedini MR. Evaluation of hypoglycemic and hypolipidemic effects of internal septum of walnut fruit in alloxan-induced diabetic rats. Afr J Tradit Complement Altern Med 2016; 13(2): 94-100.
31. Moodi H, Hosseini M, Abedini MR, Hassanzadeh-Taheri M,Hassanzadeh-Taheri M. Ethanolic extract of Iris songarica rhizome attenuates methotrexate-induced liver and kidney damages in rats. Avicenna J Phytomed 2020; 10(4): 372-383.
32. Serki E, Vazifeshenas Darmiyan K, Ezi S, Bayat J, Shahamat F, Ghiravani Z, et al. Effects of colostrum on sperm parameters , sex hormones and testes histopathological changes in diabetic rats. J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(141): 83-94 (Persian).
33. Hoshyar R, Sebzari A, Balforoush M, Valavi M, Hosseini M. The impact of Crocus sativus stigma against methotrexate-induced liver toxicity in rats. J Complement Integr Med 2020; 17(2).
34. Hassanzadeh-Taheri M, Ahmadi-Zohan A, Mohammadifard M, Hosseini M. Rosmarinic acid attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and cognitive impairment in rats. J Chem Neuroanat 2021;117:102008.
35. Shrilatha B, Muralidhara. Occurrence of oxidative impairments, response of antioxidant defences and associated biochemical perturbations in male reproductive milieu in the Streptozotocin-diabetic rat. Int J Androl 2007; 30(6): 508-518.
36. Tseng C-H. The effect of metformin on male reproductive function and prostate: An updated review. World J Mens Health 2021; 40(1): 11-29.
37. Song J, Gao X, Tang Z, Li H, Ruan Y, Liu Z, et al. Protective effect of Berberine on reproductive function and spermatogenesis in diabetic rats via inhibition of ROS/JAK2/ NFκB pathway. Andrology 2020; 8(3): 793-806.
38. Krasteva I, Momekov G, Zdraveva P, Konstantinov S, Nikolov S. Antiproliferative effects of a flavonoid and saponins from Astragalus hamosus against human tumor cell lines. Pharmacogn Mag 2008; 4(16): 269-272.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

39. Saleem S, Shaharyar MA, Khusroo MJ, Ahmad P, Rahman RU, Ahmad K, et al. Anticancer potential of rhamnocitrin 4′-β-d-galactopyranoside against N-diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. Mol Cell Biochem 2013; 384(1-2): 147-153.
40. Veras ASC, Gomes RL, Almeida Tavares ME, Giometti IC, Cardoso APMM, da Costa Aguiar Alves B, et al. Supplementation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and aerobic exercise improve functioning, morphology, and redox balance in prostate obese rats. Sci Rep 2021; 11(1): 6282.
41. Castro T, Martinez D, Isabel B, Cabezas A, Jimeno V. Vegetable Oils Rich in Polyunsaturated Fatty Acids Supplementation of Dairy Cows' Diets: Effects on Productive and Reproductive Performance. Animals (Basel) 2019; 9(5): 205.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]