

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

Behzad Mesbahzadeh¹,
Mohammadmehdi Hassanzadeh-Taheri²,
Khadijeh Vazifeshenas-Darmiyani³,
Negar Moodi⁴,
Mehran Hosseini⁵

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: mehranhosseini@yahoo.co.in)

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

بهزاد مصباح زاده¹

محمد مهدی حسن زاده طاهری²

خدیجه وظیفه شناس درمیان³

نگار مودی⁴

مهران حسینی⁵

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 الکلی اکلیل‌الملک 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 الکلی‌الملک در دوزهای 150mg/kg و 300mg/kg به صورت جداگانه و یا ترکیبی، به صورت 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 الکلی‌الملک سطح تستوسترون و پارامترهای اسپرمی (تعداد، تحرک و حیات) را به طور معنی‌داری ارتقا و پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش داد ($P < 0/01$)، اما اثر کاهنده قند خون نداشت ($P > 0/05$). مصرف همزمان عصاره با متفورمین اثرات سودمند متفورمین بر روی تستوسترون ($P < 0/01$) و پراکسیداسیون لیپیدی ($P < 0/001$) را افزایش داد. مصرف همزمان عصاره در بالاترین دوز (300 mg/kg) با متفورمین توانست به طور معنی‌داری اثرات متفورمین بر شاخص‌های بافت‌شناسی بیضه را بهبود بخشد (همگی $P < 0/05$)، اما تاثیر معنی‌داری بر روی پارامترهای اسپرمی نداشت.

استنتاج: اکلیل‌الملک اثر کاهنده قندخون ندارد و مصرف همزمان آن با متفورمین تداخلی در اثرات کاهنده قندخون این دارو ایجاد نمی‌کند. اما اثر هم‌افزایی مثبتی در بهبود پراکسیداسیون لیپیدی، سطح تستوسترون و بافت‌شناسی بیضه با متفورمین دارد.

واژه‌های کلیدی: دیابت، متفورمین، اکلیل‌الملک، اسپرم، بیضه

مقدمه

که در سال 2017 میزان بروز این بیماری در دنیا برابر 22/9 میلیون و شیوع آن در همین سال برابر 476 میلیون

امروزه اهمیت بیماری دیابت و ضرورت کنترل آن بر کسی پوشیده نیست. آمارهای جهانی نشان می‌دهند

E-mail: Mehranhosseiny@yahoo.co.in

مؤلف مسئول: مهران حسینی - بیرجند: دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

1. استادیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

2. استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

3. دانشجوی دکتری تخصصی یوشیمی 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

مورد بوده است، که از این تعداد $1/37$ میلیون نفر به دلیل 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 پیش‌دیابتی 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 (3-7). 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 این که 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 هایپرگلیسمی 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 این که 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 بالخصوص عوارض آن بر روی دستگاه تولید مثل به شمار می‌آید (10،11). 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 غالباً به صورت همزمان و یا به تنهایی از گیاهان دارویی در کنار داروهای اصلی خود استفاده می‌کنند (12-14).

یکی از گیاهان دارویی که به راحتی در دسترس عموم مردم می‌باشد، اکلیل‌الملک است. اکلیل‌الملک که با نام ناخنک نیز در ایران شناخته می‌شود جهت درمان سنگ کلیه، 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 متأسفانه 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، تری‌ترین‌ها، گلیکوزیدها، گلیکولیپیدها و درصد قابل توجهی از اسیدهای چرب بلند زنجیر غیر اشباع (PUFA) می‌باشد (17). به نظر می‌رسد اثرات سودمند اکلیل‌الملک به دلیل پروفاایل اسیدهای چرب تشکیل‌دهنده آن باشد و تحقیقات گذشته نشان داده‌اند که اسیدهای چرب نقش مهمی در عملکرد دستگاه تولیدمثلی جنس نر دارند (18-20).

استاندارد (سیکل تاریکی/روشنایی 12 ساعته، دمای 22 ± 2 درجه سانتی گراد و رطوبت 25-30 درصد) درون قفس های پلاستیکی از جنس پلی پروپیلن (شرکت رازی راد-ایران) نگهداری شدند. حیوانات همگی و در طول طرح دسترسی آزادانه به آب شهری و غذای استاندارد حیوانات آزمایشگاهی (شرکت بهپرو، 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 دانه ها) از مراتع اطراف شهرستان بیرجند تهیه شد. سپس توسط گیاه شناس مجرب شناسایی و هویت آن تایید گردید و یک نمونه کامل آن نیز در هر بار یوم دانشکده کشاورزی آرشو شد (کد: 125). غلاف های تازه اکلیل الملک جدا شد و در سایه و دمای اتاق خشک گردید. سپس دانه ها جدا شده و توسط آسیاب برقی کوچک پودر شدند. پودر به دست آمده با نسبت 1:10 (حجم:وزن) با الکل 80 درجه به مدت 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 اوپراتور تغلیظ شد و در نهایت هر 10 میلی لیتر از محلول غلیظ شده به یک عدد پتری دیش 12 سانتی متری منتقل شده و درون آون و در دمای 45 درجه سانتی گراد باقی مانده حلال آن، ظرف مدت 24 ساعت تبخیر و پودر باقی مانده جمع آوری شد (25). بازدهی عصاره دهی حدود 20 درصد بود.

روش دیابتی کردن: ایجاد دیابت در موش ها با استفاده از تزریق ماده استرپتوزوتوسین (سیگما، آمریکا) انجام شد. بدین منظور موش های 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، موش های با قند خون ناشتای بیش تر از 350 mg/dL به

مطالعات قبلی بیان کرده اند که عصاره آبی و یا الکلی اکلیل الملک دارای خواص ضد التهابی و آنتی اکسیدانی است و همچنین اثرات محافظت کنندگی کبدی در برابر مواد شیمیایی - کارسینوژن را دارد (21-23). بررسی اثر آنتی اکسیدانی (جلوگیری از پراکسیداسیون لیپوئیک اسید) و مهار رادیکال های آزاد (free radical scavenging) عصاره متانولی اکلیل الملک نشان داده است که این گیاه خاصیت مهار پراکسیداسیون لیپیدی بیش تر از ترولوکس (آنالوگ هیدروفیل ویتامین E و کوئرستین را دارد اما خاصیت خنثی سازی رادیکال های آزاد آن حدود سه برابر کم تر از ترولوکس و کوئرستین می باشد، با این حال از گیاهانی مثل موسیر (*Allium hirtifolium* Boiss) و حنظل (*Citrulus colocynthis* L Schrad) توانایی خنثی سازی رادیکال های آزاد بیش تری دارد (24). نتایج مطالعه قبلی ما نیز نشان داد این گیاه تا دوز 2000 mg/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 ارگان های حیاتی بدن موش های صحرایی (از جمله گنادها) از خود نشان نداد (16). با توجه به غنی بودن دانه های اکلیل الملک از اسیدهای چرب PUFA و همچنین خاصیت آنتی اکسیدانی آن در مهار پراکسیداسیون لیپیدی، این مطالعه با هدف بررسی اثرات مصرف همزمان عصاره الکلی اکلیل الملک با داروی متفورمین (یکی از رایج ترین داروهای کنترل دیابت) در موش های نر دیابتی طراحی و اجرا شد.

مواد و روش ها

حیوانات: در این پژوهش تجربی از موش های صحرایی نر نژاد ویستار با دامنه وزنی 200-220 گرم (8-9 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 هیچ گونه مداخله نگهداری شدند. در طول مدت پژوهش حیوانات در شرایط

نشده بود، انتخاب شدند (29، 22، 16). دوز مت فورمین در موش‌های دیابتی براساس مطالعات قبلی که دامنه 500-50 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 به صورت روزانه انجام شد. قبل از شروع مداخلات همه موش‌ها وزن شده و هر هفته نیز وزن گیری مجدد از آن‌ها انجام شد. جهت تهیه عصاره دوز مورد نیاز برای هر موش محاسبه و مقدار مورد نیاز عصاره یا پودر مت فورمین برای هر موش درون لوله آزمایش جداگانه با یک سی سی نرمال سالین حل شده و گاوآژ شد. به عنوان مثال برای یک موش 200 گرمی از گروه 7 (مت فورمین + عصاره 300mg/kg) درون یک لوله آزمایش 60 میلی گرم عصاره به همراه 100 میلی گرم مت فورمین ریخته شد و سپس در یک سی سی نرمال سالین حل شده و به موش مربوطه گاوآژ شد.

روشن نمونه برداری: پس از 4 هفته مداخله، حیوانات یک شب ناشتا شده و در روز 29، پس از توزین با استفاده از تزریق درون صفاقی ترکیب کنامین (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 میلی گرم 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

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 به مدت 4 هفته بدون هیچ مداخله‌ای نگهداری شدند (28).

گروه بندی و انجام مداخلات: در نهایت 48 سر موش با قندخون ناشتای بیش تر از 350 mg/dL به طور 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 گاوآژ شدند.

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

گروه 3 (مت فورمین): موش‌های دیابتی که با دوز 500mg/kg مت فورمین (گلوکوفاز فرانسو) گاوآژ شدند (14، 26).

گروه 4 (عصاره 150mg/kg): موش‌های دیابتی که با دوز 150mg/kg عصاره اکلیل‌الملک گاوآژ شدند.

گروه 5 (عصاره 300mg/kg): موش‌های دیابتی که با دوز 300mg/kg عصاره اکلیل‌الملک گاوآژ شدند.

گروه 6 (مت فورمین + عصاره 150mg/kg): موش‌های دیابتی که با دوز ترکیبی 500mg/kg مت فورمین و 150mg/kg عصاره اکلیل‌الملک مورد گاوآژ قرار گرفتند.

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

تیمار موش‌ها به صورت خوراکی و روزانه یک نوبت برای 28 روز متوالی انجام شد. قابل ذکر است دوزهای عصاره براساس مطالعات قبلی که در آن‌ها تجویز خوراکی اثرات ضد التهابی و ضد آلزایمیری را نشان داده بودند و در دوزهای یاد شده هیچ اثر سمی گزارش

(ایران) و دستگاه اتوآنالایزر شرکت هیتاچی (ژاپن) انجام شد. اندازه گیری هورمون تستوسترون با استفاده از کیت ارزیابی تستوسترون حیوانی (مونوباند، آمریکا) و دستگاه خوانشگر الیزا انجام شد.

سنجش پراکسیداسیون لیپیدی: پراکسیداسیون لیپیدی در بافت بیضه با اندازه گیری سطح مالون دی آلدئید (MDA) که در واقع یک محصول نهایی پروسه پراکسیداسیون می باشد، مورد سنجش قرار گرفت. جهت آماده سازی هر نمونه 100 میلی گرم از بافت بیضه در 900 میکرولیتر بافر فسفات (0/1 مولار)، سرد هموژن گردید، سپس به مدت 15 دقیقه با دور 3000 در دمای 4 درجه سانتیفریوژ شده و محلول رویی جهت سنجش غلظت پروتئین و پراکسیداسیون لیپیدی جمع آوری شد. 20 میکرولیتر از محلول رویی جهت سنجش پروتئین با 200 میکرولیتر واکنشگر رنگ آبی کوماسی (G250) مخلوط شد و به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. در نهایت جذب نمونه ها توسط خوانشگر الیزا در طول موج 595 نانومتر اندازه گیری شد. برای تهیه منحنی استاندارد از غلظت های مختلف آلبومین سرم گاوی (10 الی 100 میکروگرم در سی سی) استفاده شد (31).

با استفاده از محلول استوک تترا اتوکسی پروپان (4/18 مولار) هفت غلظت استاندارد به صورت سریالی (40-0/625 میکرومولار) تهیه شد. برای سنجش غلظت MDA، 100 میکرولیتر از سوپرناتانت نمونه (با استاندارد) با 600 میکرولیتر اسید فسفریک 10 درصد و 200 میکرولیتر تیوباربتوریک اسید 0/67 درصد مخلوط شد (33). سپس لوله ها درون بن ماری و در دمای 90 درجه سانتی گراد به مدت 60 دقیقه انکوبه شدند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، نمونه ها 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. نمونه ها به مدت 20 دقیقه با دور 5000 در دمای 4 درجه سانتیفریوژ شده و محلول رویی آن ها (مابع صورتی رنگ) برداشته شد و جذب هر نمونه در طول موج 532

عدد تیغ جراحی شماره 11 قطعه قطعه شده و دو میلی لیتر 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 CO₂ قرار گرفت (5 درصد CO₂، 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 هموسیتر که لامل سنگی روی آن قرار داده شده بود، منتقل و شمارش تعداد اسپرم ها با بزرگنمایی 100 برابر انجام شد (32).

جهت ارزیابی تعداد اسپرم های 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. بدین منظور حداقل 10 فیلد میکروسکوپی بازدید شد و تعداد کل اسپرم های مشاهده شده و همچنین اسپرم های متحرک ثبت شدند (27). بررسی حیات اسپرم ها با استفاده از تکنیک رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین انجام شد. به طور 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). اسپرم های با سر رنگ شده (صورتی) به عنوان اسپرم های مرده و اسپرم های با سر بی رنگ یا بسیار کم رنگ به عنوان زنده دسته بندی شدند و تعداد آن ها در هر فیلد ثبت شد (27).

انجام آزمایشات بیوشیمیایی: اندازه گیری قند خون موش ها با استفاده از کیت قند خون شرکت بیونیک

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 پارافمالدهید، با یک برش عرضی هر بیضه به دو قسمت تقسیم شد. سپس مراحل آنگیری 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 گزلیل صورت گرفت (هر ظرف 45 دقیقه). سپس 3 ساعت نمونه‌ها در سه ظرف حاوی پارافین مذاب قرار گرفتند و نهایتاً بلوک‌های پارافینی از نمونه‌ها به دست 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 گزلیل 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 هموسیستمتر 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 قرار گرفتند. به‌طور خلاصه برای اندازه‌گیری مساحت سطح مقطع هر لوله اسپرم‌ساز 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 به دست آمد. میانگین مساحت سطح مقطع لوله‌های اسپرم‌ساز و مساحت اپیتلیوم زایشی به میکرومتر مربع برای تمام گروه‌ها محاسبه و گزارش شد (27،18،11). ارزیابی اسپرماتوزن 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 (اسپرماتوزن 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 اسکور 2، در صورت وجود فقط سلول‌های سرتولی + اسپرماتوگونی اسکور 3، وجود سلول‌های سرتولی + اسپرماتوگونی + تعداد کم اسپرماتوسیت اسکور 4، وجود سلول‌های سرتولی + اسپرماتوگونی + تعداد زیاد اسپرماتوسیت اسکور 5، موارد اسکور قبل + تعداد کم اسپرماتیدهای اولیه اسکور 6، موارد اسکور قبل + تعداد زیادی اسپرماتیدهای اولیه اسکور 7، موارد قبلی + وجود کم‌تر از 5 اسپرماتوزوآ در لومن اسکور 8، در صورتی 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 اسپرماتوزن کامل بود و نقضی 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 ناپارامتری 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.

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 آلدئید در گروه‌های مورد مطالعه

گروه	متغیر	قند خون ناشتا (میلی گرم بر دسی لیتر)	تستوسترون (نانوگرم بر میلی لیتر)	مالون دی آلدئید (نانومول میلی گرم پروتئین)
کنترل		10600±1489	180±0/17	22/12±188
مدل دیابتی		*41775±45/44	*009±0/02	*54/75±3/61
مت فورمین		*#21625±30/41	*#0/47±0/06	*#3325±2/12
عصاره 150		†*441/12±50/75	†*#024±0/02	†*#41/75±2/91
عصاره 300		†*375/37±33/32	†*#086±0/11	*#3362±2/38
متفورمین+عصاره 150		*#23400±24/05	†*#072±0/12	†*#2800±1/77
متفورمین+عصاره 300		*#21250±24/29	†*#1/2±0/10	†*#2375±1/98

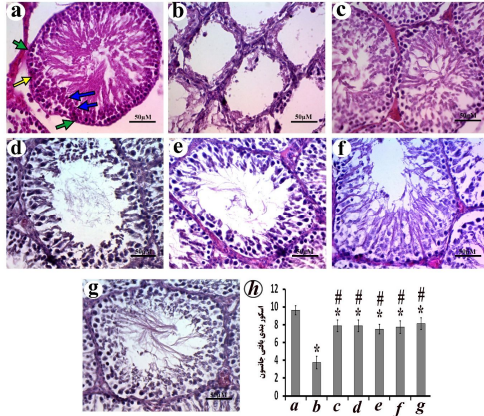
مقادیر به صورت انحراف معیار ± میانگین برای هر گروه (n=8) ارائه شده است. مقایسه بین گروهی با آزمون واریانس یکطرفه و پس آزمون توکی انجام شد. * تفاوت معنی دار (P < 0/05) در مقایسه با گروه کنترل؛ # تفاوت معنی دار (P < 0/05) در مقایسه با گروه مدل دیابتی؛ † تفاوت معنی دار (P < 0/05) در مقایسه با گروه مت فورمین

قندخون موش‌های دیابتی به طور معنی داری (حدود 4 برابر) بیش تر از موش‌های سالم بود (P < 0/001). تیمار موش‌های دیابتی با داروی مت فورمین سبب کاهش معنی دار سطح قندخون آن‌ها در مقایسه با موش‌های دیابتی گروه مدل شده بود (P < 0/001) اما همچنان به طور معنی داری بیش تر از گروه کنترل سالم بود. به عبارت دیگر، مت فورمین 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 کاهش قندخونی را در بر نداشت و قندخون ناشتا در هر دو گروه دریافت کننده عصاره با دوزهای 300mg/kg و 150mg/kg با موش‌های گروه مدل دیابتی تفاوت معنی داری نداشت. اگرچه دوز 300mg/kg عصاره اکلیل‌الملک قندخون را در موش‌ها اندکی کاهش داده بود اما این کاهش از نظر آماری معنی دار نبود. مقایسه قندخون گروه دریافت کننده مت فورمین با گروه‌های دریافت کننده ترکیب مت فورمین و عصاره

(هر دو دوز) تفاوت معنی داری 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 تیمار شده با مت فورمین به طور معنی داری سطح تستوسترون بالاتری در مقایسه با گروه مدل داشتند (P < 0/001)، با این حال همچنان سطح تستوسترون در این گروه حدود 4 برابر کم تر از سطح نرمال بود (P < 0/001). مصرف عصاره الکلی اکلیل‌الملک در یک اثر وابسته به دوز سبب افزایش معنی دار سطح تستوسترون در موش‌های دیابتی شده بود. سطح تستوسترون در گروه دریافت کننده دوز 300 mg/kg عصاره به طور معنی داری بیش تر از گروه مت فورمین و همچنین گروه دریافت کننده 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 دریافت کننده دوز همزمان مت فورمین با عصاره به طور معنی داری بیش تر از گروه‌های متناظر دریافت کننده عصاره و همچنین دریافت کننده مت فورمین به تنهایی بودند.

اندازه گیری MDA به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در بافت بیضه موش‌های مورد مطالعه نشان داد که سطح MDA در گروه مدل دیابتی به طور معنی داری بیش تر از گروه کنترل بود (P < 0/001). تیمار موش‌های دیابتی با مت فورمین سبب کاهش معنی دار 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 مت فورمین سبب کاهش معنی دار 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 در گروه‌های دریافت کننده دوز همزمان مت فورمین



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 اکلیل‌الملک 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، رنگ آمیزی 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)

* 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 اسپرم‌ساز، مساحت اپیتلیوم زایشی و نسبت اپیتلیوم زایشی به مساحت لوله‌ها در گروه‌های مورد مطالعه

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

مقادیر به صورت انحراف معیار \pm 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.

با عصاره، به طور معنی‌داری کم‌تر از گروه‌های متناظر دریافت‌کننده عصاره و همچنین دریافت‌کننده مت فورمین به تنهایی بود. سطح MDA در گروه دریافت‌کننده همزمان مت فورمین 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 به طور منظم حضور داشته و اسپرماتوزنز کامل بود اما در گروه مدل دیابتی مساحت لوله‌های اسپرم‌ساز به طور قابل توجهی کوچک‌تر و اپیتلیوم‌زایشی آن‌ها دچار تغییرات تحلیل رونده شده بود، به صورتی که در این گروه اسپرماتوزوآ، اسپرماتید و اسپرماتوسیت در لوله‌های اسپرم‌ساز قابل مشاهده نبود. از جمله دیگر تغییرات مشاهده شده در گروه مدل دیابتی می‌توان به نابسامانی تیغه پایه اپیتلیوم، تعداد کم اسپرماتوگونی‌ها و همچنین واکنش‌ها شدن اپیتلیوم‌زایشی در برخی از توبول‌ها اشاره نمود. گروه‌های دریافت‌کننده مت فورمین و عصاره چه به صورت جداگانه و چه به صورت مصرف همزمان، سیمای بافت شناسی بهتری را در قیاس با گروه مدل دیابتی از خود نشان دادند. از نظر اسپرماتوزنز ضریب جانسون در تمام گروه‌های مداخله به طور معنی‌داری بالاتر از گروه مدل دیابتی بود اما همچنان با وضعیت نرمال از نظر آماری تفاوت داشت (تصویر شماره 1).

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 ارزیابی 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 به طور معنی‌داری در قیاس با گروه کنترل کاهش پیدا کرده بود ($P < 0/001$). در مقایسه با

جدول شماره 3: مقایسه میانگین پارامترهای اسپرمی در گروه های

مورد مطالعه

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

مقادیر به صورت انحراف معیار \pm 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 اکلیل الملک با متفورمین در کنترل عوارض دیابت بر روی عملکرد دستگاه تولید مثل در موش های صحرایی نر اجرا گردید. در این مطالعه موش های دیابتی به مدت 28 روز با دوزهای مختلف عصاره (150 و 300 mg/kg) و متفورمین (500 mg/kg) به صورت جداگانه و یا ترکیبی روزانه یک نوبت به صورت خوراکی تیمار شدند. در پایان مطالعه یافته ها نشان داد، القای دیابت سبب آسیب به دستگاه تولید مثل موش ها در سطوح مختلف مورفولوژیک و عملکردی شده بود. به نظر می رسد یکی از مکانیسم های ایجاد کننده آسیب از طریق افزایش فعالیت های استرس اکسیداتیو بوده باشد، چنان که شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در بیضه موش های دیابتی به طور چشمگیری (حدود 2 برابر) در قیاس با گروه کنترل افزایش یافته بود. مهم ترین یافته های این مطالعه نشان دادند که عصاره اکلیل الملک در دوزهای استفاده شده در این مطالعه نتوانست سبب کاهش قندخون در موش های دیابتی شود. با این حال تیمار موش های دیابتی با عصاره اکلیل الملک سبب کاهش معنی دار پراکسیداسیون لیپیدی، افزایش غلظت تستوسترون، بهبود پارامترهای اسپرمی و پارامترهای

گروه مدل دیابتی، تمامی مداخلات توانسته بودند سبب افزایش معنی دار پارامترهای یاد شده در موش های دیابتی شوند. گروه دریافت کننده ترکیب متفورمین با دوز 300mg/kg عصاره، شاخص های بافتی مشابه گروه کنترل و در سطح نرمال داشت. عصاره به خصوص در دوز 300mg/kg توانسته بود به طور معنی داری اثرات سودمند متفورمین بر بافت بیضه موش های دیابتی را ارتقا دهد. هم راستا با تغییرات بافت شناسی مقایسه میانگین وزن بیضه در موش ها نیز نشان داد که وزن بیضه در موش های دیابتی به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش یافته بود ($P < 0/001$). تمامی مداخلات به طور معنی داری از کاهش وزن بیضه در موش های دیابتی جلوگیری کردند، اما وزن بیضه در هیچ یک از گروه های مداخله به اندازه مقادیر نرمال نبود.

نتایج بررسی پارامترهای اسپرمی در جدول شماره 3 ارائه شده است. تعداد، قابلیت حیات و درصد اسپرم های متحرک در گروه مدل دیابتی به طور معنی داری کم تر از گروه کنترل بود. در گروه دریافت کننده متفورمین تعداد اسپرم ها، تحرک و قابلیت حیات آن ها به طور معنی داری بیش تر از گروه مدل بود اما همچنان با مقادیر نرمال از نظر آماری تفاوت داشت. عصاره اکلیل الملک در یک اثر وابسته به دوز سبب افزایش معنی دار در تعداد اسپرم ها، قابلیت حیات و تحرک اسپرم ها شده بود اما این اثرات در مقایسه با گروه دریافت کننده متفورمین معنی دار نبود. حتی در گروه دریافت کننده دوز mg/kg 150 عصاره تعداد اسپرم ها و درصد اسپرم های متحرک به طور معنی داری کم تر از مقادیر متناظر در گروه مت فورمین بود. مصرف همزمان عصاره اکلیل الملک با مت فورمین اگر چه سبب ارتقای پارامترهای اسپرمی در مقایسه با گروه مدل دیابتی شده بود، اما در مقایسه با گروه دریافت کننده مت فورمین این اثرات تفاوت معنی داری را نشان نداد. به عبارت دیگر عصاره اثر هم افزایی را با مت فورمین در خصوص پارامترهای اسپرمی نشان نداد.

مورفولوژیک بیضه شد. در مقام مقایسه به جز در پارامتر غلظت تستوسترون، در بقیه پارامترهای مورد مطالعه اثرات متفورمین بهتر و یا برابر با عصاره اکلایل‌الملک بود. عصاره اکلایل‌الملک 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 اکلایل‌الملک، 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 متفورمین تاثیری بر بهبود کیفیت پارامترهای اسپرمی در قیاس با گروه دریافت‌کننده متفورمین (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 هایپرگلیسمی 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 هایپرگلیسمی نگهداری شوند، تا ضمن ایجاد عوارض ثانویه دیابت در آن‌ها، آسیب‌های اولیه ناشی از سمیت استرپتوزوتوسین (و نه هایپرگلیسمی) 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 اکلایل‌الملک 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 آنتی‌دیابتیک اکلایل‌الملک 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 استرپتوزوتوسین 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 مدل‌های 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 تولید مثلی نر گردیده است. متفورمین با کاهش استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز در بیضه‌ها 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 و کاهش التهاب می‌توانند سبب پیشگیری و یا تعدیل آسیب‌های دستگاه تولید مثلی در موش‌های دیابتی شوند (27، 37). همان‌طور که پیش‌تر در مقدمه عنوان شد گیاه اکلایل‌الملک با دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهاب در درمان بیماری‌های روماتیسمی، سردرد، مشکلات گوارشی، سنگ کلیه و... استفاده می‌شده است (۱۶، ۱۷، ۲۱). اما تا کنون هیچ مطالعه‌ای تاثیر آن بر دیابت و سیستم تولید

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 لینولنیک 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 در شرایط *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 احتمالاً 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 تسکین 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 100-300 mg/kg

مثلی در بیماران و مدل‌های حیوانی دیابت را بررسی نکرده است. در مطالعه‌ای که در سال 2008 توسط Krasteva و همکارانش انجام شد اثر آنتی‌پرولیفراتیو فلاونوئیدهای Glycoside rhamnocitrin 4'-βD-galactopyranoside (RGP) و مخلوط اسپانین‌های 1 و 2 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 الیزا استفاده شد و نتایج حاصل از آن نشان داد فلاونوئیدهای گیاه اکلیل‌الملک 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 اکلیل‌الملک 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 اکلیل‌الملک (*Astragalus hamosus L*) را بر سرطان کبد القا شده با ان‌دی‌اتیل نیتروزآمین در رت‌های نژاد ویستار بررسی کردند. یافته‌های آن‌ها نشان داد که RGP در یک اثر وابسته به دوز توانست با کاهش آنزیم‌های آسپارات آمینو ترانسفراز، آلانین آمینو ترانسفراز، 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

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 هیپوگلیسمیک این دارو ایجاد نمی‌کند. به نظر می‌رسد گیاه اکلیل‌الملک اگرچه نتوانست قندخون را در موش‌های دیابتی کاهش دهد اما از طریق مهار پراکسیداسیون لیپیدی و احتمالاً التهاب قادر است آسیب باروری ناشی از هایپر گلیسمی 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 این که این گیاه اثرات هیپوگلیسمیک و سمیت خوراکی ندارد می‌توان در تحقیقات آینده بر روی موش‌های سالم به خصوص موش‌های سالم پیر نیز مورد بررسی قرار گیرد. 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-Darimiyan 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-Darimiyan 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-Darimiyan 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-Rebello 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, Ghalibafabbaghi A, Chodari L. Diabetes

- 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, Dorrانpour 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. Hamed 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

- for antioxidant activity. *Iran J Pharm Res* 2008; 7(2): 149-154.
25. Honari N, Shaban P, Nasser S, Hosseini M. Ethanol 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, Khodaghali 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. Ethanol 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.

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.