

## اثر پیتید زیست فعال مشتق از ماهی ساردین بر لوله‌های اسپرم‌ساز متعاقب القاء تنش حرارتی در موش صحرائی نر بالغ

مهسا ولی زاده<sup>۱\*</sup>، وحید نجاتی<sup>۱</sup>، علی شالیزار جلالی<sup>۲</sup>، ابراهیم حسین نجدگرمی<sup>۱</sup> و غلامرضا نجفی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۸/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۹



### چکیده

آسیب ناشی از تنش حرارتی در بیضه‌ها یکی از علل ناباروری در مردان و اغلب پستانداران محسوب می‌شود. پیتیدهای زیست فعال فعالیت ضد اکسایشی قوی در برابر رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال دارند. در این مطالعه، ۴۲ سر موش صحرائی نر بالغ به صورت تصادفی به ۶ گروه ۷ تایی شامل: گروه اول: شاهد (دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد)، گروه دوم: پیتید زیست فعال (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی، روزانه)، گروه سوم: تحت شوک حرارتی (۴۳ درجه سانتی‌گراد، گروه‌های چهارم، پنجم و ششم تحت شوک حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد به همراه تیمار با پیتید زیست فعال با دوز ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی تقسیم شدند. بعد از اتمام دوره تیمار (۴۵ روز)، بافت بیضه به منظور بررسی‌های بافت-شناسی و بیوشیمیایی جداسازی شد. آسیب‌شناسی بافتی، تخریب بافتی گسترده‌ای را به دنبال القاء تنش حرارتی در بافت بیضه نشان داد. تنش حرارتی سبب افزایش معنی‌دار نیتریک اکساید گردید ( $P < 0/05$ ). در موش‌های تحت تنش حرارتی درمان شده با پیتید زیست فعال دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بهبودی مشاهده نشد. تیمار حیوانات با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آثار مثبتی بر اسپرماتوژنز و ساختار لوله‌های اسپرم‌ساز نشان داد. نتایج بررسی میزان نیتریک اکساید، کاهش این فاکتور بیوشیمی را به دنبال تیمار با پیتید با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نشان داد ( $P < 0/05$ ). نتایج حاصل از این مطالعه آثار آنتی‌اکسیدانتی پیتید زیست فعال مشتق از ماهی ساردین را در شاخص‌های بافتی و بیوشیمی بافت بیضه نشان داد.

**واژه‌های کلیدی:** تنش حرارتی، تنش اکسیداتیو، آنتی‌اکسیدانت، دستگاه تولیدمثلی نر، موش صحرائی

\* نویسنده مسئول، تلفن: مهسا ولی زاده، ۰۹۰۳۳۳۶۶۴۵، پست الکترونیکی: mahsa\_valizadeh20@yahoo.com

### مقدمه

امروزه بسیاری از عوامل داخلی و خارجی می‌توانند موجب افزایش دمای بافت بیضه شده و روند اسپرماتوژنز طبیعی را برهم بزنند، تنش حرارتی به‌عنوان یکی از مشکلات اصلی در باروری مردان مطرح شده و تلاش برای اصلاح آن همچنان ادامه دارد (۱۶). اخیراً یک مطالعه اپیدمیولوژیک نشان داده است که دمای زیاد محیط اثرات مخربی بر بافت بیضه داشته و منجر به آپوپتوز سلول‌های جنسی می‌شود (۱۹). گرما علاوه بر اثرات منفی مختلف بر

به‌طورکلی، ناباروری در ۱۵ درصد زوجین مشاهده می‌شود که در این میان باتوجه به نقش ۴۰ درصدی ناشی از اختلالات مردان، اهمیت بررسی، شناسایی و اصلاح این اختلالات برای کمک به زوجین نابارور امری ضروری به نظر می‌رسد (۳۳). در این راستا، امروزه مشخص شده است که بسیاری از عوامل از جمله تنش اکسیداتیو (۳۹)، تنش حرارتی (۴۳) و تنش نیتروژاتیو (۳۲) می‌توانند منجر به ناباروری در مردان شوند. باتوجه به این‌که در زندگی

گذشته، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانتی نقش مهمی در غیرفعال کردن ROS دارد و درمان‌های مختلف آنتی‌اکسیدانتی برای اندام‌های مختلف از جمله بیضه به کار می‌رود (۱۴). علاوه بر این، عوامل آنتی‌اکسیدانتی به‌عنوان روش‌های درمانی برای مقابله با نارسایی‌های تولیدمثل ناشی از تنش اکسیداتیو معرفی شده‌اند (۱۰).

موجودات دریایی، تقریباً نیمی از کل تنوع زیستی دنیا را تشکیل داده و مخازن غنی از اجزای عملکردی از جمله منبع غنی از پروتئین برای تولید پپتیدهای زیست فعال هستند (۲۲). ماهی‌ها به‌عنوان منبعی از اسیدهای چرب غیراشباع، پلی‌ساکاریدها، آنتی‌اکسیدانت‌ها و پپتیدهای زیست فعال شناخته شده‌اند (۳۷). پپتیدهای زیست فعال همانند تری پپتیدهای به دست آمده از پروتئین‌های ماهی ساردین (۱۱)، مواد ارگانیک تشکیل شده از اسیدهای آمینه هستند که با پیوند کووالانسی (پیوندهای آمیدی یا پپتیدی) به هم متصل می‌شوند و به‌عنوان قطعاتی از پروتئین‌های خاص، تأثیر مثبتی بر عملکرد و شرایط بدن دارند (۲۷). چرا که این مواد فعالیت هورمونی و دارویی از خود نشان می‌دهند و براساس نحوه عملکرد خود می‌توانند به‌عنوان ضد میکروب، ضد ترومبوتیک، ضد فشارخون، مواد افیونی، تعدیل‌کننده سیستم ایمنی بدن و آنتی‌اکسیدانت طبقه‌بندی شوند (۹ و ۴۱). پپتیدهای زیست فعال، فعالیت ضد اکسایشی قوی در برابر رادیکال‌های آزاد و سایر گونه‌های اکسیژن فعال دارند. مکانیسمی که پپتیدها از طریق آن اثرات ضد اکسایشی خود را ایفا می‌کنند به‌طور کامل آشکار نشده است هرچند تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که پپتیدها و پروتئین‌های هیدرولیز شده با حذف رادیکال‌های آزاد و شلاته کردن یون‌های فلزی از اکسیداسیون آنزیمی و غیرآنزیمی ممانعت می‌کنند (۱۳ و ۵۱). پتانسیل آنتی‌اکسیدانتی هیدرولیزهای پروتئینی بستگی به ترکیب آمینواسیدها و شکسته شدن ساختار سوم پروتئین‌های والد به کمک آنزیم‌های هیدرولیزی دارد که منجر به افزایش دسترسی به آمینواسیدهای با فعالیت آنتی‌اکسیدانتی می‌شود.

بافت بیضه، میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن را نیز افزایش می‌دهد (۴۷). تنش حرارتی و به دنبال آن القاء تنش اکسیداتیو در بافت بیضه و رابطه نزدیک بین این دو عامل در مطالعات مختلف بیان شده است (۳۱) که در این راستا، مکانیسم‌های مختلفی برای مقابله با آسیب‌های ناشی از تنش گرمایی بر باروری مردان مورد استفاده قرار گرفته است. براساس گزارشات اخیر، اثرات مضر تنش حرارتی می‌تواند بصورت عمده ناشی از افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) باشد که این گونه‌های فعال اکسیژن خود باعث پراکسیداسیون لیپیدی، دناچوره شدن پروتئین‌ها و آسیب DNA می‌شوند (۱۲ و ۲۴).

نیتریک اکساید (NO) به‌عنوان مولکولی با فعالیت بالا، قابل‌انتشار و ناپایدار شناخته شده است که در رده‌های سلولی مختلف تولید شده و عملکردهای مختلفی را بر عهده دارد. در همین راستا نشان داده‌اند که این ماده بر فعالیت دستگاه‌های مختلف بدن از جمله سیستم‌های تولیدمثلی نر و ماده تأثیر گذاشته و همچنین نقش آن در آپوپتوز سلول‌های زایا در بیضه به‌خصوص در اسپرماتوسیت‌های اولیه به اثبات رسیده است (۵۲).

شواهد زیادی نشان می‌دهد که NO در مقادیر کم در انواع فرایندهای تولیدمثل مردان مانند اسپرماتوزن، اسپرمیوزن، حرکت، متابولیسم و ظرفیت اسپرم دخیل است (۳۲) این در حالی است که همبستگی منفی بین سطح NO و تحرک اسپرم، مورفولوژی آن و قطعه‌قطعه شدن DNA گزارش شده است (۴۴).

در حالت فیزیولوژیک، سیستم آنتی‌اکسیدانتی بدن با تکیه بر سد دفاعی آنتی‌اکسیدانتی خارجی و داخلی با تنش اکسیداتیو و اثرات ROS مقابله می‌کند، که آنتی‌اکسیدانت‌های داخلی بدن از جمله سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز و همچنین آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی بیرونی همانند توکوفرول و ویتامین C این نقش را ایفا می‌کنند (۵۰). طبق گزارشات

یک‌سوم قسمت تحتانی بدن در حمام آب گرم به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. موش‌ها به‌صورت تصادفی به ۶ گروه ۷ تایی تقسیم شدند. گروه اول به‌عنوان گروه شاهد روزانه ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، در حالی که گروه دوم، گروه پیتید زیست فعال، روزانه ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پیتید زیست فعال به‌صورت گاوژ دریافت کرد (۳). گروه سوم، گروه تحت شوک حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد روزانه به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفت. گروه چهارم، پنجم و ششم نیز یک ساعت بعد از القاء شوک حرارتی (۴۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم)، به ترتیب پیتید زیست فعال با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت خوراکی (گاوژ) دریافت کردند. بعد از اتمام دوره تیمار ۴۵ روزه، حیوانات به‌منظور بررسی میزان وزن بدن توزین شدند. موش‌ها با زایل‌زین به میزان ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم و کتامین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بیهوش و سپس با جابجایی مهره‌های گردنی کشته شدند. برای انجام بررسی‌های بافتی و بیوشیمیایی، بیضه‌ها از بدن حیوانات جداسازی شده و بعد از وزن‌کشی بیضه‌ها، بیضه چپ برای تهیه مقاطع بافت‌شناسی به فرمالین ۱۰ درصد و بیضه راست جهت اندازه‌گیری میزان NO بافتی، به فریزر -۷۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافت. متعاقب ۷۲ ساعت، بیضه‌های فیکس شده، پاساژ روتین بافتی شده و قالب‌های پارافینه از آنها تهیه شد. در ادامه، برای بررسی‌های بافتی، مقاطعی با ضخامت ۵ میکرون از قالب‌های پارافینه تهیه و از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) برای رنگ‌آمیزی مقاطع بافتی استفاده شد. به‌منظور ارزیابی قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخامت اپیتلیوم زایا بافت بیضه، ۹۰ لوله اسپرم‌ساز به‌صورت تصادفی انتخاب شدند و قطر کوچک و قطر بزرگ لوله‌ها با استفاده از عدسی مدرج چشمی اندازه‌گیری شد. پس از اندازه‌گیری، عدد حاصل در ضریب

بعضی از این ترکیبات، فعالیت فوق‌العاده‌ای را در پاکسازی رادیکال‌های آزاد و غیرفعال کردن یون سوپراکسید دارا می‌باشند که نشان دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانتی بالای این پیتیدها می‌باشد (۱۸).

باتوجه به اثرات بالقوه و متعدد پیتید زیست فعال مشتق از ماهی ساردین به‌ویژه اثرات آنتی‌اکسیدانتی آن، در مطالعه حاضر از این ماده جهت مقابله با اثرات زیان‌بار ناشی از تنش حرارتی استفاده گردید. در این راستا، بافت بیضه‌ی موش‌های صحرائی پس از پروسه القا تنش حرارتی و درمان با پیتید زیست فعال، از نظر تغییرات لوله‌های اسپرم‌ساز و بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

## مواد و روشها

برای انجام این تحقیق، ۴۲ سر موش صحرائی نر بالغ (20  $\pm$  180 گرم) از خانه حیوانات دانشکده علوم دانشگاه ارومیه تهیه شد. به‌منظور سازگاری حیوانات با شرایط محیطی، حیوانات در شرایط غذایی بدون محدودیت، تحت چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای محیط ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ روز قرار گرفتند. پیتید زیست فعال بکار برده شده در این مطالعه از تخمیر ماهی ساردین (*Sardinella sp.*) در کنار نمک تهیه گردید. به‌منظور استخراج پیتید مورد نظر، محلول تخمیر شده به‌وسیله یک دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک گردید و با همزن الکتریکی، ۱ قسمت پودر خشک‌شده با ۵ قسمت آب مقطر در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱٫۵ ساعت در حمام آبی مخلوط شدند. سپس، مخلوط به دست آمده با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید و محلول رویی به‌منظور به دست آوردن عصاره پیتیدی شفاف به‌وسیله کاغذ واتمن فیلتر شد. در انتهای کار، عصاره پیتیدی به‌وسیله خشک‌کن انجمادی خشک گردید و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای ایجاد شوک حرارتی، در طول دوره تیمار (۴۵ روز)،

ضریب میوزی (MI) نسبت تعداد اسپرماتیدهای گرد به اسپرماتوسیت‌های اولیه مشخص گردید (۴۶).

سلول‌های لیدینگ در بافت بینابینی و به صورت گروهی دیده می‌شود. همچنین دارای هسته گرد و با موقعیت مرکزی به همراه یک یا دو هستک می‌باشند. برای شمارش این سلول‌ها از عدسی مشبک چشمی استفاده شد و تعداد سلول‌های لیدینگ در یک میلی‌متر از بافت همبند بینابینی بیضه شمارش شد (۴۹). برای ارزیابی بلوغ اسپرماتوزن از مقایسه جانسن استفاده شد. بدین منظور از مقطع عرضی، ۹۰ لوله اسپرم‌ساز در هر نمونه استفاده شد و به هر لوله براساس فراسنجه‌های زیر نمره ۱ تا ۱۰ تعلق گرفت.

مخصوصاً که برای هر عدسی شیئی متفاوت است ضرب شد و اندازه نهایی برحسب میکرومتر محاسبه گردید. در ادامه، به منظور تعیین ضریب تمایز لوله‌ای (TDI) درصد لوله‌های اسپرم‌سازی که بیشتر از سه رده‌ی سلولی اسپرماتوزن تمایز یافته از سلول‌های اسپرماتوگونی و سایر سلول‌های رده اسپرماتوزن داشتند به عنوان لوله‌های TDI مثبت، محاسبه گردید (۸). همچنین، درصد لوله‌های اسپرم-ساز مثبت (SPI) که در یک مرحله و در حال اسپرمیونز (مرحله ۷ و ۸ اسپرماتوزن) بودند، ارزیابی گردید (۲۵). در ادامه، به منظور محاسبه ضریب سلول سرتولی (SCI)، نسبت تعداد سلول‌های زایا به تعداد سلول‌های سرتولی مشخص گردید (۳۶). به منظور محاسبه

جدول ۱- ارزیابی بلوغ اسپرماتوزن با استفاده از ضریب جانسن

۱۰	اسپرماتوزن کامل
۹	اسپرم زیاد، حفره میانی نامنظم
۸	اسپرم خیلی کم
۷	لوله خالی از اسپرم، وجود اسپرماتید گرد زیاد
۶	اسپرماتید گرد کم
۵	تعداد زیاد اسپرماتوسیت اولیه
۴	تعداد کم اسپرماتوسیت اولیه
۳	فقط اسپرماتوگونی دیده می‌شود
۲	عدم وجود سلول زایا، حضور سلول سرتولی
۱	لوله‌ها آتروفیک، عدم وجود سلول زایا و سرتولی (۲۳).

میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان گردید و مقدار  $P < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## نتایج

بررسی‌های میانگین وزن بدن حیوانات در پایان مطالعه تفاوت معنی‌داری را در هیچ‌یک از گروه‌ها نشان نمی‌داد. این در حالی است که میانگین وزن بیضه، پس از اتمام تیمار در گروه تحت تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد نسبت به گروه کنترل ( $P < 0.01$ ) و پیتید زیست فعال ( $P < 0.05$ ) نشان دهنده کاهش معنی‌داری بود (جدول ۱). گروه‌های دریافت‌کننده پیتیدزیست فعال با دوز ۵ و ۱۰

روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری نیتریک اکساید (NO) در سیستم‌های بیولوژیکی طراحی شده است که یکی از روش‌ها شامل استفاده از واکنش دیونیزه کردن و تشخیص با اسپکتوفتومتری است که نیتريت تولید شده توسط اکسیداسیون NO تحت شرایط فیزیولوژیکی را می‌سنجد. برای اندازه‌گیری NO از کیت سنجش نیتریک اکساید (Navand salamat, Urmia, Iran) استفاده شد. مقایسه تمامی داده‌ها در بین گروه‌ها توسط نرم‌افزار (SPSS Version 24.00)، آزمون ANOVA یک‌طرفه و سپس آزمون Duncan صورت پذیرفت. تمامی داده‌ها براساس

مقایسه با گروه کنترل است. گروه‌های تحت تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد+ دریافت‌کننده پپتید زیست فعال ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز کاهش معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهند. این در حالی است که، گروه تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد+ دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پپتید زیست فعال توانست افزایش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) را در مقایسه با گروه تنش حرارتی ایجاد نماید. این گروه نیز نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ) (جدول ۱).

جدول ۲- تأثیر استرس حرارتی و پپتید زیست فعال بر وزن بدن و بیضه. مقدار به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده است. حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ( $P < 0/05$ ) بین گروه‌های مختلف است.

Group	BW before treatment (gr)	BW after treatment (gr)	TW (gr)	TW /BW (gr)
control	172.71 $\pm$ 11.32 <sup>a</sup>	205.00 $\pm$ 21.43 <sup>a</sup>	1.433 $\pm$ 0.144 <sup>a</sup>	0.0070 $\pm$ 0.0001 <sup>a</sup>
peptide	172.14 $\pm$ 8.95 <sup>a</sup>	204.43 $\pm$ 21.45 <sup>a</sup>	1.409 $\pm$ 0.064 <sup>a</sup>	0.0069 $\pm$ 0.0005 <sup>a</sup>
43°C	171.57 $\pm$ 14.03 <sup>a</sup>	198.43 $\pm$ 10.34 <sup>a</sup>	0.349 $\pm$ 0.052 <sup>b</sup>	0.0018 $\pm$ 0.0002 <sup>b,c</sup>
43°C+5mg/kg	170.14 $\pm$ 16.52 <sup>a</sup>	204.14 $\pm$ 13.22 <sup>a</sup>	0.317 $\pm$ 0.021 <sup>b</sup>	0.0015 $\pm$ 0.0002 <sup>b</sup>
43°C+10mg/kg	171.14 $\pm$ 8.84 <sup>a</sup>	202.71 $\pm$ 12.63 <sup>a</sup>	0.379 $\pm$ 0.031 <sup>b</sup>	0.0019 $\pm$ 0.0001 <sup>c</sup>
43°C+20mg/kg	171.57 $\pm$ 15.93 <sup>a</sup>	205.14 $\pm$ 10.22 <sup>a</sup>	0.483 $\pm$ 0.035 <sup>c</sup>	0.0023 $\pm$ 0.0002 <sup>d</sup>

TW: Testis Weight (وزن بیضه)

BW: Body Weight (وزن بدن)

حرارتی به دلیل آسیب شدید بافتی، تغییر بارزی در جهت بهبودی دیده نشد. اما گروه تیمار شده با پپتید زیست فعال با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بعد از القای تنش حرارتی بهبودی معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) را نسبت به گروه تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد (شکل ۱).

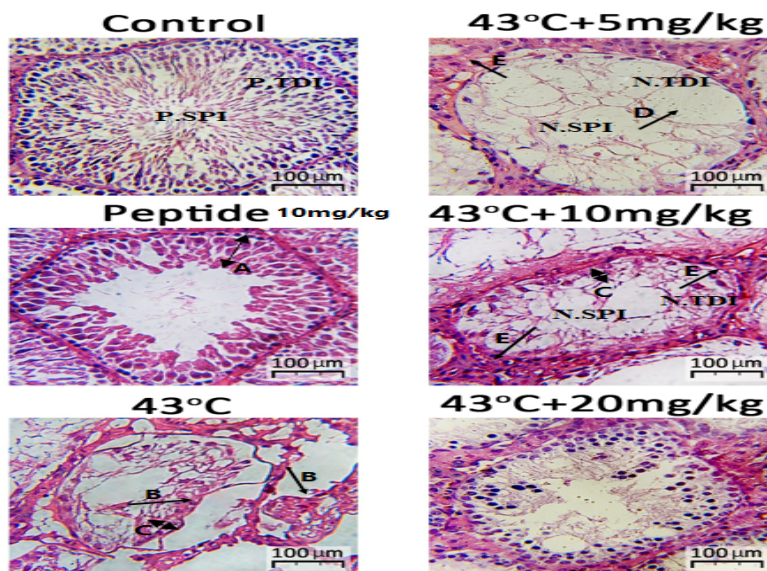
در همین راستا، ارزیابی‌های مورفومتریک اثبات کرد که قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخامت اپیتلیوم زایا در گروه تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد و دو گروه ۴۳ درجه سانتی‌گراد + پپتید زیست فعال با دو دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) نسبت به گروه کنترل دارند. گروه تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد درمان شده با پپتید زیست فعال با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر

میلی‌گرم بر کیلوگرم به همراه تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با گروه تنش حرارتی، اختلاف معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) در وزن بیضه نداشتند اما نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) را نشان دادند. در گروه ۴۳ درجه سانتی‌گراد به همراه پپتید زیست فعال با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، وزن بیضه افزایش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) نسبت به گروه تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد و همچنین گروه کنترل داشت. نتایج حاصل از بررسی نسبت وزن بیضه بر کل وزن بدن، حاکی از کاهش معنادار در گروه تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد در

بررسی‌های بافت بیضه نشان داد که ساختار لوله‌های اسپرم‌ساز و اپیتلیوم زایا در گروه‌های کنترل دارای ساختار طبیعی است. در گروه پپتید زیست فعال نیز آسیب جزئی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. در بیضه‌ی موش‌های گروه تحت تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد، گروه‌های تنش حرارتی + پپتید با دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، افزایش لوله‌های اسپرم‌ساز آتروفی شده، کاهش ارتفاع اپیتلیوم زایا، واکوئوله شدن لوله‌ها، التهاب تونیکا آلبوژینه‌آ، پرخونی عروق و ادم بافتی مشاهده گردید. کاهش ارتفاع اپیتلیوم زایا در گروه پپتید زیست فعال با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز دیده شد. در گروه‌های دریافت‌کننده پپتید زیست فعال دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تحت تنش

است. بررسی ضخامت اپیتلیوم در گروه پپتید زیست فعال نیز نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ ) (جدول ۲).

کیلوگرم افزایش معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) در مقایسه با گروه تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد دارد. اختلاف بین گروه ۴۳ درجه سانتی‌گراد + پپتید زیست فعال ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل نیز معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) بوده



شکل ۱- مقطع عرضی بافت بیضه در موش صحرایی نر. (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اؤزین). گروه کنترل: ساختار طبیعی بافت بیضه را نشان می‌دهد، همچنین قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، ضخامت اپیتلیوم زایا و مقدار بافت همبند بینابینی طبیعی است. گروه پپتید (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن): A. ضخامت اپیتلیوم زایا کاهش را نشان می‌دهد. گروه‌های ۴۳ درجه سانتی‌گراد، ۴۳ درجه سانتی‌گراد+ پپتید با دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم: B. لوله‌های اسپرم‌ساز آتروفی شده، C. کاهش ارتفاع اپیتلیوم زایا، D. واکوئوله شدن لوله‌ها، E. ادم بافتی در این سه گروه مشاهده می‌شود. گروه ۴۳ درجه سانتی‌گراد+ پپتید با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم: ساختار بافتی طبیعی می‌باشد. ادم بینابینی کاهش یافته، فرایند اسپرماتوژنز نیز به حالت طبیعی بازگشته است. P.SPI: Positive SPI, N.SPI: Negative SPI, P.TDI: Positive TDI, N.TDI: Negative TDI

جدول ۳- تأثیر استرس حرارتی و پپتید زیست فعال بر پارامترهای مورفومتریک در موش صحرایی نر بالغ. مقدار به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده است. حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ( $P < 0.05$ ) بین گروه‌های مختلف است

Group	Sperm tubular diameter ( $\mu\text{m}$ )	Epithelium thickness ( $\mu\text{m}$ )
control	131.20 $\pm$ 8.60 <sup>a</sup>	42.62 $\pm$ 7.87 <sup>a</sup>
peptide	130.70 $\pm$ 10.66 <sup>a</sup>	40.99 $\pm$ 6.82 <sup>b</sup>
43°C	64.48 $\pm$ 5.89 <sup>b</sup>	2.49 $\pm$ 1.11 <sup>c</sup>
43°C+5mg/kg	68.16 $\pm$ 8.35 <sup>c</sup>	2.83 $\pm$ 1.27 <sup>c</sup>
43°C+10mg/kg	69.98 $\pm$ 9.04 <sup>c</sup>	2.96 $\pm$ 1.15 <sup>c</sup>
43°C+20mg/kg	72.86 $\pm$ 5.43 <sup>d</sup>	4.76 $\pm$ 2.25 <sup>d</sup>

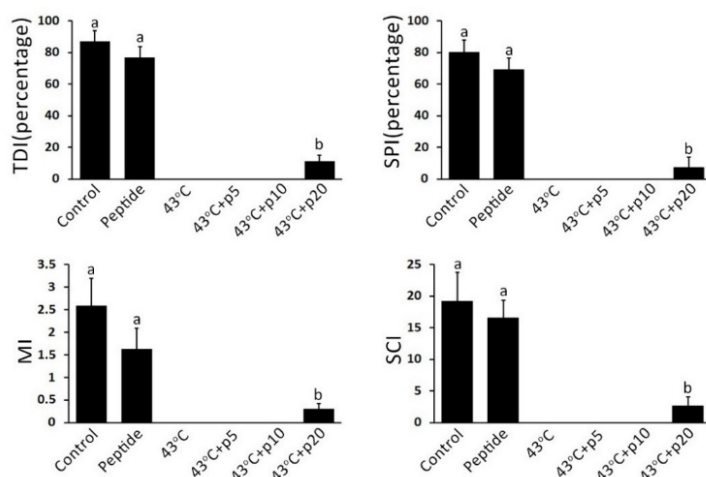
سانتی‌گراد+ پپتید زیست فعال با دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. بررسی‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های ۴۳ درجه سانتی‌گراد + پپتید زیست فعال با دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با گروه تنش ۴۳ درجه سانتی‌گراد وجود ندارد. اما اختلاف معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) بین دو گروه ۴۳ درجه سانتی‌گراد و ۴۳ درجه سانتی‌گراد + پپتید زیست فعال با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دیده می‌شود. مابین دو گروه تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد+ پپتید زیست فعال با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با گروه کنترل نیز اختلاف معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) مشاهده می‌شود (شکل ۲).

یافته‌ها نشان داد که تنش حرارتی سبب افزایش درصد

در بررسی ضریب تمایز لوله‌ای مثبت، کاهش معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) در تعداد لوله‌های با ضریب تمایزی مثبت در گروه‌های تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد، ۴۳ درجه

سرتولی نسبت به گروه تنش حرارتی مشاهده نشده است. در گروه ۴۳ درجه سانتی‌گراد+ پپتید زیست فعال با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) در ضریب سلول سرتولی نسبت به گروه تنش حرارتی مشاهده شد. این گروه اختلاف معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نیز نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۲). نتایج حاصل از بررسی ضریب میوزی نشان می‌دهد که تنش حرارتی سبب کاهش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) ضریب میوزی در گروه‌های تحت تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد، ۴۳ درجه سانتی‌گراد تیمار شده با پپتید زیست فعال با دو دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل شده است. مابین گروه‌های پپتید زیست فعال با دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با گروه تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد اختلاف معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) مشاهده نگردید. گروه ۴۳ درجه سانتی‌گراد+ پپتید زیست فعال با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) را نسبت به گروه ۴۳ درجه سانتی‌گراد نشان می‌داد. گروه ۴۳ درجه سانتی‌گراد تیمار شده با پپتید با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اختلاف معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد (شکل ۲).

لوله‌هایی با ضریب اسپرمیونز منفی و کاهش درصد لوله‌هایی با ضریب مثبت گردیده است. نتایج حاصل نشان داد که ضریب اسپرمیونز در گروه‌های ۴۳ درجه سانتی‌گراد، ۴۳ درجه سانتی‌گراد دریافت کننده پپتید زیست فعال با دو دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) را نسبت به گروه کنترل دارند. این در حالی است که، گروه‌های ۴۳ درجه سانتی‌گراد + پپتید زیست فعال با دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه تنش حرارتی ۴۳ درجه را نشان نمی‌دهد. اما گروه ۴۳ درجه سانتی‌گراد تیمار شده با پپتید زیست فعال با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) را نسبت به گروه تحت تنش ۴۳ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد، همچنین این گروه اختلاف معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۲). ضریب سلول سرتولی در گروه‌های تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد، ۴۳ درجه سانتی‌گراد+ پپتید زیست فعال با دو دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهند. در گروه‌های ۴۳ درجه سانتی‌گراد + پپتید زیست فعال با دوز ۵ و ۱۰ اختلاف معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) در ضریب سلول



شکل ۲- تأثیر استرس حرارتی و پپتید زیست فعال بر فعالیت‌های اسپرماتوزن

TDI: ضریب تمایز لوله‌ای، SPI: ضریب اسپرمیونز، SCI: ضریب سلول سرتولی، MI: ضریب میوزی مقدار به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده است. حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ( $P < 0.05$ ) بین گروه‌های مختلف است.

داد. این در حالی است که در گروه تنش حرارتی + پپتید زیست فعال با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه ۴۳ درجه سانتی‌گراد اختلاف مشاهده می‌شود اما این اختلاف معنی‌دار نیست. گروه تحت تنش ۴۳ درجه تیمار شده با پپتید ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد ( $P < 0/05$ ). در بررسی میانگین تعداد سلول‌های لیدیک در گروه ۴۳ درجه سانتی-گراد و گروه‌های تحت تنش حرارتی + پپتید زیست فعال با دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) مشاهده گردید. گروه ۴۳ درجه سانتی‌گراد+ پپتید زیست فعال با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) نسبت به گروه تنش حرارتی نشان می‌دهد. اختلاف معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) بین دو گروه تنش حرارتی ۴۳ + پپتید زیست فعال با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و کنترل نیز وجود دارد (جدول ۳).

نتایج حاصل از شمارش سلول‌های زایا نشان داد که میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید در یک میلی‌متر مربع در گروه‌های ۴۳ درجه سانتی‌گراد و ۴۳ درجه سانتی‌گراد دریافت کننده پپتید زیست فعال با دو دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) را در مقایسه با گروه کنترل داشتند. بررسی رده‌های سلولی گروه پپتید زیست فعال با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) را نسبت به گروه تنش حرارتی نشان داد. مابین گروه ۴۳ درجه سانتی‌گراد+ پپتید ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با گروه کنترل نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). همچنین، میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در یک میلی‌متر مربع در گروه تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد و گروه‌های تحت تنش ۴۳ درجه سانتی‌گراد دریافت کننده پپتید زیست فعال با دو دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) را نشان

جدول ۴- مقایسه میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک، سرتولی و لیدیک در گروه‌های مختلف آزمایشی

Group	Spermatogonia	Spermatocyte	Spermatid	Sertoli	Lydig
control	56.12±8.79 <sup>a</sup>	89.71±16.01 <sup>a</sup>	285.71±49.35 <sup>a</sup>	16.99±3.09 <sup>a</sup>	8.23±2.26 <sup>a</sup>
peptide	41.19±14.22 <sup>b</sup>	67.56±12.32 <sup>b</sup>	208.41±30.15 <sup>b</sup>	16.80±3.25 <sup>a,b</sup>	6.87±1.96 <sup>b</sup>
43°C	0.22±0.61 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	15.56±2.50 <sup>c</sup>	4.10±0.97 <sup>c</sup>
43°C+5mg/kg	0.23±0.65 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	15.54±2.90 <sup>c</sup>	4.01±1.43 <sup>c</sup>
43°C+10mg/kg	0.50±1.41 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	15.93±2.94 <sup>b,c</sup>	4.30±0.94 <sup>c</sup>
43°C+20mg/kg	30.31±8.25 <sup>d</sup>	0.93±1.88 <sup>c</sup>	38.09±7.58 <sup>d</sup>	16.02±2.77 <sup>b,c</sup>	6.22±1.23 <sup>d</sup>

مقدار به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است. حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ( $P < 0/05$ ) بین گروه‌های مختلف است

پپتید زیست فعال با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، افزایش معنی‌داری در ( $P < 0/05$ ) بهبود اسپرماتوژنز در مقایسه با گروه تنش حرارتی مشاهده گردید. اختلاف معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) مابین دو گروه کنترل و تنش حرارتی ۴۳ درجه درمان شده با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز مشاهده شد (شکل ۳).

نتایج مربوط به ارزیابی بلوغ اسپرماتوژنز با استفاده از شاخص جانسن مشخص نمود که در گروه تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد و گروه‌های تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد + پپتید زیست فعال با دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) در شاخص جانسن نسبت به گروه کنترل وجود دارد. در گروه تنش حرارتی +



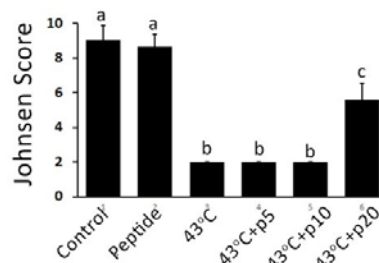
## اکساید در موش صحرایی نر

مقدار به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده است. حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ( $P < 0.05$ ) بین گروه‌های مختلف است

## بحث و نتیجه‌گیری

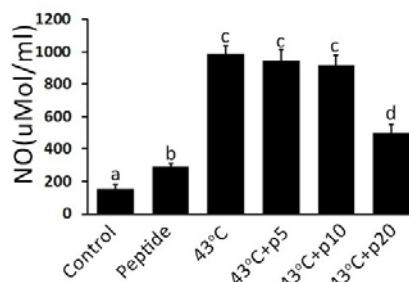
در این مطالعه کاهش چشمگیر وزن بیضه به دنبال القاء یک دوره ۴۵ روزه تنش حرارتی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. این کاهش وزن و حجم بیضه به دلیل آپوتوز در سلول‌های جنسی حساس به دما با فعالیت میوزی بالا (۳۱)، تنش اکسیداتیو و فعال شدن کاسپاز ۳ (عامل آپوتوز) (۲۹) اتفاق می‌افتد و این کاهش معنی‌دار وزن با مطالعات قبلی تأثیر تنش حرارتی در انسان و حیوانات در یک سو قرار دارد (۲۰، ۲۳، ۲۶ و ۲۸). درمان با کورکومین (۳۰) و ویتامین E (۴۲) به عنوان آنتی‌اکسیدانت موجب افزایش وزن بیضه و در نتیجه بیانگر نقش درمانی این دو ماده آنتی‌اکسیدانت در مقابله با تنش حرارتی بوده است. در مطالعه حاضر استفاده از پپتید زیست فعال نیز به عنوان ماده‌ای با خاصیت آنتی‌اکسیداتیو، افزایش معنی‌دار در وزن بیضه را در گروه دریافت کننده این ماده با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن نشان داد. در حالی که تیمار حیوانات با دو دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پپتید زیست فعال تأثیر مثبتی در جهت بهبودی نشان نداد. استفاده مستمر از پپتید زیست فعال استرس ریداکتیو را به دنبال دارد یکی از علل مشاهده آسیب در گروه پپتید زیست فعال است.

تکیه بر مطالعات پیشین نشان می‌دهد که، بافت بیضه یک سیستم بیولوژی متأثر از دما است که به دنبال افزایش دما تغییرات مورفولوژی و مولکولی زیادی در سلول‌های جنسی آن اتفاق می‌افتد که باعث اختلال روند اسپرماتوژنز و در نتیجه آزو اسپرمی می‌شود (۱۵). همچنین، اخیراً یک مطالعه پژوهشی نشان داده است که بافت بیضه در بین حیوانات مختلف و سویه‌های متنوع یک‌گونه از نظر



شکل ۳- تأثیر استرس حرارتی و پپتید زیست فعال بر شاخص جانسن مقدار به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده است. حروف نامشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ( $P < 0.05$ ) بین گروه‌های مختلف است.

بررسی بیوشیمیایی مربوط به سنتز نیتریک اکساید (NO) به دنبال القای تنش حرارتی نشان داد که حرارت ۴۳ درجه سانتی‌گراد سبب افزایش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) سنتز نیتریک اکساید در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. این کاهش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) در دو گروه تحت تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد درمان شده با پپتید با دو دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز نسبت به گروه کنترل مشاهده می‌شود. تیمار با پپتید زیست فعال با دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بعد از القای تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد، اختلاف معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) را نسبت به گروه ۴۳ درجه سانتی‌گراد نشان نمی‌داد. در حالی که در گروه ۴۳ درجه سانتی‌گراد+ پپتید زیست فعال با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) در مقایسه با گروه تنش حرارتی مشاهده گردید. بین دو گروه تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد درمان شده با پپتید با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و گروه کنترل نیز اختلاف معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۴- تأثیر استرس حرارتی و پپتید زیست فعال بر میزان نیتریک

با مطالعات پیشین نشانگر کاهش قابل توجه قطر لوله‌ها، کاهش ضخامت اپیتلیوم زایا در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه است (۲۳).

از طرفی، در مطالعه حاضر بررسی برش‌های بافتی نشان داد که تنش حرارتی به‌تنهایی موجب کاهش ضریب تمایز اسپرمیوزن، میوزی، سلول‌های سرتولی و شاخص جانسن می‌شود. این در حالی است که پپتید زیست فعال با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانسته است به مقدار قابل توجهی از این روند تخریبی جلوگیری نماید. در همین راستا، نشان داده شده است که مواد با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی توانایی بسیار زیادی برای مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از حرارت داشته و با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی، آسیب پروتئین‌ها و DNA در مقابل تنش حرارتی، سلول‌های جنسی و در رأس آن‌ها اسپرماتوگونی‌ها را حفظ می‌کنند (۳۸). با توجه به اینکه، مطالعات پیشین خاصیت آنتی-اکسیدانتی پپتیدهای استخراج شده از پروتئین‌های ماهی را اثبات می‌کند (۳۵)، پپتید زیست فعال استخراج شده از مارماهی با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی، می‌تواند از اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد در بافت بیضه جلوگیری کند. از طرفی، با توجه به اینکه دو دوز پایین تجویز شده اثرات مثبتی را در جهت بهبودی شاخص‌های بافتی نشان ندادند، مقایسه دوزهای مختلف پپتید زیست فعال مشتق از ماهی ساردین در این مطالعه نشان دهنده اثرات مثبت دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم این ماده به دلیل خاصیت آنتی-اکسیدانتی بالا بر آسیب‌های ناشی از تنش حرارتی بافت بیضه است. تنش گرمایی با افزایش ROS و سرکوب بیان ژن‌های در ارتباط با مکانیسم‌های دفاعی در برابر آسیب DNA، باعث آسیب DNA در سلول‌های جنسی می‌شود. همچنین، نیتریک اکساید به‌عنوان یکی از رادیکال‌های آزاد به شمار می‌رود و از طرفی تنش حرارتی منجر به تنش اکسیداتیو شده و از طریق تولید رادیکال‌های آزاد همانند  $O_2$ ،  $NO$ - و سایر گونه‌های فعال اکسیژن به سلول‌ها و بافت‌ها آسیب می‌رساند. آسیب DNA ناشی از تنش بر

حساسیت به دما، تفاوت‌های قابل توجهی دارد که به نظر می‌رسد به دلیل اختلاف در توانایی حیوانات در حفظ دمای بیضه و اختلاف در حساسیت سلول‌های زایا در گونه‌های مختلف نسبت به تنش حرارتی باشد (۴۲). بعلاوه، در مطالعات دیگر نشان داده شده است که بیشترین اثرات تنش حرارتی در اسپرماتوسیت‌های اولیه در مرحله پاکتی تن (۴) و اسپرماتیدهای گرد اتفاق می‌افتد (۴۲) که در صورت افزایش تنش سایر سلول‌ها نیز مستعد مرگ هستند (۲۹). با افزایش درجه حرارت، علاوه بر اسپرماتوسیت، اسپرماتید و اسپرم، اسپرماتوگونی‌ها (مقاوم‌ترین رده سلولی) نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۴۲). در مطالعه حاضر، القاء استرس حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ روز، موجب کاهش جمعیت سلولی اسپرماتوگونی به‌صورت فعال و غیرفعال در اپیتلیوم لوله‌های منی ساز شد. بعلاوه، اکثر لوله‌ها به‌شدت آسیب دیده و تنها تعداد کمی از سلول‌های بنیادی باقی‌مانده بود. در همین راستا، کانتر و همکاران نشان داده‌اند که احتمالاً بیشتر سلول‌های مرده در تنش حرارتی از طریق فاگوسیتوز توسط سلول‌های سرتولی از بین می‌روند (۲۳). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شده است که کاهش چشمگیر در تعداد سلول‌های رده اسپرماتوژنیک وابسته به دما بوده و با افزایش دما تا ۴۳ درجه سانتی‌گراد، آتروفی اپیتلیوم جنسی، توقف کامل اسپرماتوژن و از بین رفتن کامل اسپرماتید و اسپرم دیده می‌شود (۱۷). با بررسی مورفولوژی لوله‌های اسپرم‌ساز در این مطالعه، تشکیل واکوئل‌ها در لوله‌های اسپرم‌ساز، سلول‌های جنسی با هسته پیکنوزه (۴۰)، تخریب پل‌های سیتوپلاسمی بین سینسشیوم‌ها و در نتیجه تخریب سلول‌های سالم کناری (۴۰) آسیب به بافت بینابینی لوله‌های اسپرم‌ساز (۴۲)، بی‌نظمی و سستی سلول‌های اسپرماتوژنیک، کاهش سلول‌های سرتولی و سلول‌های لیدیگ (۳۰)، خالی شدن لوله‌های اسپرم‌زا از انواع سلول و ناپدید شدن اسپرماتوسیت‌ها، اسپرماتیدها (۳۰)، توقف کامل اسپرماتوژن (۲۸) دیده شد. پژوهش حاضر هم‌راستا

مربوط به سیتوکروم c و در نتیجه آپوپتوز سلول‌های زایا است (۲۱). در این مطالعه نیز سنتز NO به دنبال القای تنش حرارتی به مدت ۴۵ روز افزایش را نشان می‌دهد. استفاده از پپتید زیست فعال استخراج شده از ماهی ساردین، به دنبال القاء تنش حرارتی کاهش نسبی سنتز NO را نشان می‌دهد. علیرغم اینکه انتظار می‌رود آنتی-اکسیدانت‌ها از آسیب اکسیداتیو جلوگیری کرده یا آن را به‌طور بالقوه کاهش دهند، مصرف کنترل نشده آنها می‌تواند منجر به آسیب شود (۴۷). علی‌رغم تأثیرات مثبت پپتیدهای زیست فعال در سطوح فیزیولوژیکی و سلامت بدن، اثرات منفی و مضر بالقوه‌ی پپتیدهای زیست فعال همانند سمیت، آلرژی‌زایی و جهش‌زایی نیز به اثبات رسیده است (۳۴). در این پژوهش نیز استفاده مستمر پپتیدهای زیست فعال بر بافت بیضه اثر سوء نشان داده و منجر به آسیب به بافت بیضه و اختلال روند اسپرماتوژنز شده است. همچنین، بررسی‌های پیشین در مورد مصرف آنتی‌اکسیدانت‌ها به‌تنهایی در موش‌های صحرایی نشان داده است که وجود حد نرمالی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن برای عملکرد مناسب این بافت ضروری می‌باشد. این در حالی است استفاده از آنتی‌اکسیدانت‌ها در شرایط نرمال خود به‌تنهایی می‌تواند باعث بروز استرس ریداکتیو (Reductive Stress) شده و از عملکرد مناسب بافت بیضه جلوگیری نماید (۳۸ و ۳۶).

نتایج این پژوهش نشان داد که درمان موش‌های تحت تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ روز توسط پپتید زیست فعال با دوز ۲۰ میلی‌گرم باعث بهبود آسیب بافت بیضه ناشی از تنش حرارتی می‌شود که این اثرات مثبت به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانتی پپتید زیست فعال و توانایی این ماده در از بین بردن رادیکال‌های آزاد تشکیل شده به دنبال ایجاد تنش اکسیداتیو است. در نتیجه استفاده از پپتید زیست فعال به‌عنوان یک ماده درمانگر جهت بهبود شرایط ناشی از آسیب‌های اکسیداتیو پیشنهاد می‌شود.

جنبه‌های مختلف باروری تأثیر می‌گذارد (۲۶). افزایش میزان ROS عملکرد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی را مهار یا بیان این آنزیم‌ها را کاهش می‌دهد که ممکن است باعث افزایش تنش اکسیداتیو گردد (۱، ۲ و ۴۵). بررسی‌های تنش حرارتی ناشی از واریکوسل افزایش چشمگیر پارامترهای تنش اکسیداتیو مانند ROS و پراکسیداسیون لیپیدی را نشان داده و در نتیجه بر باروری جنس نر تأثیر می‌گذارد (۵). در سلول‌های جنسی نر، غشای پلاسمایی سرشار از اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد که نسبت به ROS بسیار حساس هستند. MDA و NO محصولات حاصل از ROS هستند که برای بررسی میزان تنش اکسیداتیو بافت بیضه استفاده می‌شوند. افزایش میزان NO باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های جنسی می‌شود. بیان بیش از اندازه NO و در نتیجه افزایش آپوپتوز به دنبال القاء کریپتورکیدیسم در آزمایشگاه در موش‌های صحرایی مشاهده شد (۴۸). اخیراً مشخص شده است که NO عملکردهای مختلفی را در سیستم تولیدمثلی جنس نر دارد. مکانیسم اصلی آسیب اسپرم ناشی از نیتریک اکساید، مهار تنفس میتوکندریایی و بیوسنتز DNA است. مقدار کم NO برای تحرک اسپرم و بقای آن ضروری است. همچنین بر فعالیت اسپرم موش صحرایی نیز اثر می‌گذارد. در مقابل، افزایش میزان NO، تنفس میتوکندریایی اسپرم را مختل کرده و مانع تحرک اسپرم می‌شود. همچنین میزان کم NO درصد اسپرم‌های ظرفیت‌پذیر و واکنش آکروزومی را افزایش داده و به تلقیح اسپرم و تخمک کمک می‌کند. اما اثرات مخرب NO نیز بر فعالیت اسپرم و فرایند لقاح به اثبات رسیده است (۴۵). اثرات مضر NO توسط مولکول‌های فعال بیولوژیکی تولید شده توسط واکنش NO با آنیون سوپراکسید و اسید پراکسی نیتروز ایجاد می‌شود و این ترکیبات آسیب‌های بافتی مختلفی را ایجاد می‌کنند (۷). NO جریان خون بیضه‌ای را نیز کنترل می‌کند. یکی از مکانیسم‌های آپوپتوزی وابسته به NO از طریق ایجاد اختلال در جریان Bax/Bcl-2 در میتوکندری و فعال شدن مسیر مرگ سلولی

## سپاسگزاری

مطالعه تقدیر و تشکر می‌شود.

از معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه برای تأمین هزینه این

## منابع

- ۱- امینی، ن.، شیروی، ع.، میرازی، ن.، حجتی، و.، عباسعلی پورکیبیره، ر.، ۱۳۹۹. اثرات حفاظتی عصاره میوه گیاه تمشک (*Rubus fruticosus L.*) بر عملکرد آنتی‌اکسیدانتی در موش‌های صحرایی نر دیابتیک القا شده با استرپتوزوتوسین، مجله پژوهش‌های جانوری، جلد ۳۳، شماره ۲، صفحات ۲۲۵-۲۳۸.
- ۲- بینا، ر.، حیدری، ر.، محمدزاده، م.، و ایلخانی‌پور، م. ۱۳۹۸. تأثیر عصاره آبی گیاه آویشن (*Thymus vulgaris L.*) بر روی پارامترهای بیوشیمیایی خون و بافت کبدی در موش‌های of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food chemistry*, 118, PP: 559-565.
- 12- Casao, A., Cebrián, I., Asumpção, M. E., Pérez-Pé, R., Abecia, J. A., Forcada, F., Cebrián-Pérez, J. A., and Muño-Blanco, T., 2010. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reproductive biology and endocrinology*, 8, 59 p.
- 13- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., and Nokihara, K., 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein, *Journal of agricultural and food chemistry*, 44, PP: 2619-2623.
- 14- Cocuzza, M., Sikka, S. C., Athayde, K. S., and Agarwal, A., 2007. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *International braz journal*, 33, PP: 603-621.
- 15- Dada, R., Gupta, N. P., and Kucheria, K., 2003. Spermatogenic arrest in men with testicular hyperthermia, Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis, 23, PP: 235-243.
- 16- Durairajanayagam, D., Agarwal, A., and Ong, C., 2015. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress, *Reproductive biomedicine online*, 30, PP: 14-27.
- 17- Durairajanayagam, D., Sharma, R. K., du Plessis, S. S., and Agarwal, A., 2014. Testicular heat stress and sperm quality, *Male Infertility*. Springer, pp. 105-125.
- صحرائی ماده تحت استرس بی‌حرکتی، مجله پژوهش‌های جانوری، جلد ۳۲، شماره ۱، صفحات ۱-۱۵.
- ۳- حیدری، ش.، حسین نجدگرامی، الف.، و نیکو، م.، ۱۳۹۶. تأثیر مخلوط پپتیدهای زیست فعال ماهی ساردین، بر ظرفیت آنتی-اکسیدانتی سرم، پراکسیداسیون چربی‌ها و فراسنجه‌های خونی در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی ویستار تحت استرس بی‌حرکتی، مجله پژوهش‌های جانوری، جلد ۳۰، شماره ۳، صفحات ۲۷۹-۲۸۸.
- 4- Agarwal, A., Hamada, A., and Esteves, S. C., 2012. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1, *Nature Reviews Urology*, 9, 678 p.
- 5- Agarwal, A., Makker, K., and Sharma, R., 2008. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *American journal of reproductive immunology*, 59, PP: 2-11.
- 6- Amin, M., Razi, M., Sarrafzadeh Rezaei, F., Shalizer Jalali, A., and Najafi, G., 2018. Berberine inhibits experimental varicocele-induced cell cycle arrest via regulating cyclin D1, cdk4 and p21 proteins expression in rat testicles, *Andrologia*, 50, e12984 p.
- 7- Amiri, I., Sheike, N., and Najafi, R., 2006. Nitric oxide level in seminal plasma of fertile and infertile males and its correlation with sperm parameters, *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14, PP: 197-202.
- 8- Babazadeh, M., and Najafi, G., 2017. Effect of chlorpyrifos on sperm characteristics and testicular tissue changes in adult male rats, *Veterinary Research Forum, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*, 319 p.
- 9- Bhat, Z., Kumar, S., and Bhat, H. F., 2015. Bioactive peptides from egg: a review, *Nutrition Aand Food Science*.
- 10- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., and Dada, R., 2017. Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews Urology*, 14, 470 p.
- 11- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., and Nasri, M., 2010. Purification and identification

- 18- Escudero, E., Toldrá, F., Sentandreu, M. A., Nishimura, H., and Arihara, K., 2012. Antihypertensive activity of peptides identified in the in vitro gastrointestinal digest of pork meat, *Meat science*, 91, PP: 382-384.
- 19- Fang, Z. Y., Xiao, W., Chen, S. R., Zhang, M. H., Qiu, Y., and Liu, Y. X., 2019. Biologic response of sperm and seminal plasma to transient testicular heating. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 24, PP: 1401-1425.
- 20- Gasinska, A., and Hilli, S., 1990. The effect of hyperthermia on the mouse testis. *Neoplasma*, 37, 357 p.
- 21- Guo, J., Jia, Y., Tao, S. X., Li, Y. C., Zhang, X. S., Hu, Z. Y., Chiang, N., Lue, Y. H., Hikim, A. P. S., and Swerdloff, R. S., 2009. Expression of nitric oxide synthase during germ cell apoptosis in testis of cynomolgus monkey after testosterone and heat treatment, *Journal of andrology*, 30, PP: 190-199.
- 22- Harnedy, P. A., and FitzGerald, R. J., 2012. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of functional foods* 4, 6-24.
- 23- Kanter, M., Aktas, C., and Erboga, M., 2013. Heat stress decreases testicular germ cell proliferation and increases apoptosis in short term: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Toxicology and industrial health*, 29, PP: 99-113.
- 24- Khosravian, N., Razi, M., Farokhi, F., and Khosravian, H., 2014. Testosterone and vitamin E administration up-regulated varicocele-reduced Hsp70-2 protein expression and ameliorated biochemical alterations. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 31, PP: 341-354.
- 25- Kianifard, D., 2015. Protective effects of *Morus Alba* (M. Alba) extract on the alteration of testicular tissue and spermatogenesis in adult rats treated with Monosodium Glutamate, *Med. Sci*, 4, PP: 1947-1958.
- 26- Kim, B., Park, K., and Rhee, K., 2013. Heat stress response of male germ cells, *Cellular and molecular life sciences*, 70, PP: 2623-2636.
- 27- Kitts, D. D., and Weiler, K., 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery, *Current pharmaceutical design* 9, PP: 1309-1323.
- 28- Kumar Roy, V., Marak, T. R., and Gurusubramanian, G., 2016. Alleviating effect of *Mallotus roxburghianus* in heat-induced testicular dysfunction in Wistar rats, *Pharmaceutical biology*, 54, PP: 905-918.
- 29- Li, Y., Cao, Y., Wang, F., and Li, C., 2014. Scrotal heat induced the Nrf2-driven antioxidant response during oxidative stress and apoptosis in the mouse testis, *Acta histochemica* 116, PP: 883-890.
- 30- Lin, C., Shin, D. G., Park, S. G., Chu, S. B., Gwon, L. W., Lee, J. G., Yon, J. M., Baek, I. J., and Nam, S. Y., 2015. Curcumin dose-dependently improves spermatogenic disorders induced by scrotal heat stress in mice, *Food and function*, 6, PP: 3770-3777.
- 31- Majd, N. E., Sadeghi, N., Tavalae, M., Tabandeh, M. R., and Nasr-Esfahani, M. H., 2019. Evaluation of oxidative stress in testis and sperm of rat following induced varicocele, *Urology journal*, 16, PP: 300-306.
- 32- Mazhari, S., Razi, M., and Sadrkhanlou, R., 2018. Silymarin and celecoxib ameliorate experimental varicocele-induced pathogenesis: Evidences for oxidative stress and inflammation inhibition, *International urology and nephrology*, 50, PP: 1039-1052.
- 33- Minas, A., Najafi, G., Jalali, A. S., and Razi, M., 2018. Fennel induces cytotoxic effects against testicular germ cells in mice; evidences for suppressed pre-implantation embryo development, *Environmental toxicology*, 33, PP: 841-850.
- 34- Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., and Schrezenmeir, J., 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European journal of nutrition*, 47, PP: 171-182.
- 35- Najafian, L., and Babji, A. S., 2012. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications, *Peptides*, 33, PP: 178-185.
- 36- Pintus, E., Ros-Santaella, J. L., and Garde, J. J., 2015. Beyond testis size: links between spermatogenesis and sperm traits in a seasonal breeding mammal, *PloS one*, 10.
- 37- Pomponi, S. A., 1999. The bioprocess-technological potential of the sea, *Progress in Industrial Microbiology*, Elsevier, PP: 5-13.
- 38- Rashtbari, H., Razi, M., Hassani-Bafrani, H., and Najaran, H., 2018. Berberine reinforces Sertoli cells niche and accelerates spermatogonial stem cells renewal in experimentally-induced varicocele condition in rats, *Phytomedicine*, 40, PP: 68-78.

- 39- Razi, M., Sadrkhanloo, R. A., Malekinejad, H., and Sarrafzadeh-Rezaei, F., 2012. Testicular biohistochemical alterations following experimental varicocele in rats, Iranian journal of reproductive medicine, 10, 209 p.
- 40- Rockett, J. C., Mapp, F. L., Garges, J. B., Luft, J. C., Mori, C., and Dix, D. J., 2001. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice, *Biology of reproduction* 65, PP: 229-239.
- 41- Sánchez, A., and Vázquez, A., 2017. Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1, PP: 29-46.
- 42- Setchell, B., 2018. The effects of heat on the testes of mammals, *Animal Reproduction (AR)*, 3, PP: 81-91.
- 43- Shamsi-Gamchi, N., Razi, M., and Behfar, M., 2018. Testicular torsion and reperfusion: evidences for biochemical and molecular alterations. *Cell Stress and Chaperones*, 23, PP: 429-439.
- 44- Sheikh, N., Amiri, I., Najafi, R., and Goodarzi, M. T., 2010. The correlation between total antioxidant capacity and nitric oxide concentration in seminal plasma with sperm DNA damage. *African Journal of Biotechnology*, 9 p.
- 45- Sikka, S. C., 2001. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function, *Current medicinal chemistry*, 8, PP: 851-862.
- 46- Talebi, A., Alimehr, M., Alavi, M. H., Najafi, G., and Simaei, N., 2018. Comparative study of semen traits and histomorphometric features of testes of broiler breeder males with different phenotypic traits, *Veterinary Research Forum, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*, 1 p.
- 47- Wagner, H., Cheng, J. W., Ko, E. Y., 2018. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature, *Arab journal of urology*, 16, PP: 35-43.
- 48- Wechalekar, H., 2015. Direct and indirect effects of whole body heat exposure on germ cells and spermatozoa.
- 49- Weinbauer, G. F., Luetjens, C. M., Simoni, M., and Nieschlag, E., 2010. Physiology of testicular function, *Andrology*, Springer, PP: 11-59.
- 50- Zeng, M., Dong, S., Zhao, Y., and Liu, Z., 2013. Antioxidant activities of marine peptides from fish and shrimp, *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications*, PP: 449-466.
- 51- Zhou, S., and Decker, E. A., 1999. Ability of amino acids, dipeptides, polyamines, and sulfhydryls to quench hexanal, a saturated aldehydic lipid oxidation product, *Journal of agricultural and food chemistry*, 47, PP: 1932-1936.
- 52- Zini, A., Abitbol, J., Schulsinger, D., Goldstein, M., and Schlegel, P. N., 1999. Restoration of spermatogenesis after scrotal replacement of experimentally cryptorchid rat testis: assessment of germ cell apoptosis and eNOS expression, *Urology*, 53, PP: 223-227.

## Effect of Sardine- drived (*Sardinella sp.*) Bioactive peptides on seminiferous tubules Following Heat Stress Induction in Mature Male Rat

Valizadeh M.,<sup>1</sup> Nejati V.,<sup>1</sup> Shalizar-Jalali A.,<sup>2</sup> Najdgerami E.H.<sup>1</sup> and Najafi Gh.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran.

<sup>2</sup> Dept. of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran.

### Abstract

Damage due to thermal stress in the testicles is one of the causes of infertility in men and most of the mammals. Bioactive peptides have potent antioxidant activity against free radicals and reactive oxygen species. In this study, animals were randomly categorized into 6 groups; group 1 served as a control (22 °C), group 2 was a bioactive peptide (10 mg kg<sup>-1</sup> day, oral gavage, respectively), group 3 was a heat-stressed (43 °C), groups 4, 5 and 6 were heat-stressed (43 °C) along with bioactive peptides (5, 10 and 20 mg kg<sup>-1</sup> day, oral gavage, respectively). After treatment (45 days), the testes were separated for histological and biochemical studies. Histopathological analysis revealed severe testicular damage following heat stress induction. Heat stress increased nitric oxide significantly ( $P < 0/05$ ). In the heat-stressed rats treated with 5 and 10 mg / kg bioactive peptide, no improvement was observed. Treatment of animals with 20 mg / kg showed positive effects on spermatogenesis and seminiferous tubules structure. The results of nitric oxide analysis showed a decrease in this biochemical factor following peptide treatment at a dose of 20 mg / kg ( $P < 0/05$ ). The results of this study showed the antioxidant effects of sardine-derived bioactive peptide on tissue and biochemical markers of testicular tissue.

**Key words:** heat stress, oxidative stress, antioxidants, male reproductive system, rat