

اثر حفاظتی پپتیدهای زیست‌فعال بر شاخص‌های بافتی بیضه و اسپرماتوژنز در رت‌های نر تیمار شده با سایمتیدین

زیبا احمدی^۱، ابراهیم حسین نجدگرمی^{۱*}، وحید نجاتی^۱، غلامرضا نجفی^۲ و مهدی نیکو^۳

^۱ ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه علوم پایه

^۳ ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده آرتمیا و آبی‌پروری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۰۹

چکیده

براساس تحقیقات انجام شده، مصرف طولانی مدت این دارو با افزایش استرس اکسیداتیو، باعث ناباروری می‌شود. در این تحقیق تأثیرات استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال استخراج شده از ضایعات موتوماهیان بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، شاخص‌های اسپرمی، قطر لوله‌های منی‌ساز و همچنین ضخامت لایه اپیتلیوم در بافت بیضه رت‌های نر تیمار شده با سایمتیدین بررسی شد. تعداد ۳۶ عدد رت نر نژاد ویستار سالم با وزن اولیه 200 ± 40 گرم به ۶ قفس منتقل شدند و به مدت ۴۵ روز با تیمارهای غذایی (گروه C کنترل، گروه P ۲۰ میلی‌گرم پپتید، گروه CIM40 و CIM120 به ترتیب ۴۰ و ۱۲۰ گرم سایمتیدین، گروه CIM40 و CIM120 به ترتیب ۴۰ و ۱۲۰ گرم سایمتیدین + ۲۰ میلی‌گرم پپتید) تغذیه شدند. نتایج نشان داد که استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال و سایمتیدین طور معنی‌داری میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیضه را نسبت به تیمار کنترل افزایش می‌دهد ($P < 0/05$). همچنین براساس این نتایج، کاهش معنی‌دار در زنده‌مانی اسپرم و ضخامت لایه اپیتلیوم در رت‌هایی که از پپتیدهای زیست‌فعال و تیمارهای CIM40 و CIM120 استفاده کرده بودند مشاهده شد که با تیمار کنترل اختلاف معنی‌دار داشتند ($P < 0/05$). براساس این نتایج استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال همراه با سایمتیدین میزان این شاخصها را افزایش داد که با تیمار کنترل اختلاف معنی‌دار نداشتند ($P > 0/05$). به نظر می‌رسد با توجه به تأثیرات آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال که در تحقیقات قبلی گزارش شده بود، این مواد تأثیرات اکسیداتیو سایمتیدین را در بافت بیضه و همچنین اسپرمها تعدیل کرده است.

واژه‌های کلیدی: پپتیدهای زیست‌فعال، موتوماهیان، ناباروری، استرس اکسیداتیو

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۴۳۱۹۴۲۱۱۹، پست الکترونیکی: e.gerami@urmia.ac.ir

مقدمه

برای درمان این عارضه از روش‌های مختلف استفاده می‌شود که از آن جمله می‌توان به استفاده از داروی سایمتیدین (Cimetidine) اشاره کرد. این دارو به طور قابل توجهی مانع ترشح اسید معده ناشی از غذا، هیستامین، پنتاگاسترین، کافئین و انسولین می‌شود. اما مصرف مداوم آن دارای عوارض جانبی از جمله از دست دادن میل جنسی و بی‌اختیاری (۲۶)، افزایش سطح FSH و کاهش

شرایط استرس زای زندگی امروزی به همراه تغذیه نامناسب و عدم وجود مواد مناسب در مواد غذایی مصرفی، باعث انواع بیماری‌های گوارشی و قلبی-عروقی شده که یکی از این بیماری‌ها زخم معده است که در اثر ترشح بیش از حد اسید معده و در اثر عواملی مانند سوء تغذیه، استرس زیاد، استفاده مکرر از مسکن‌ها و استفاده از داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی ایجاد می‌شود (۲۹).

آسیب‌های ناشی از سمیت مصرف طولانی مدت سایمتیدین بر تولید مثل جنس نر را بهبود بخشد و باعث بهبود میزان قطر لوله‌های اسپرماتوزن و ضخامت لایه اپیتلیوم و پارامترهای اسپرمی از جمله تحرک اسپرم‌ها می‌شود. بلترام و همکاران در سال ۲۰۱۱ تأثیر ویتامین B12 را بر سایمتیدین در سیستم تولیدمثلی رت نر بررسی کردند و نتایج نشان داد که مکمل ویتامین B12 قادر به تحریک اسپرماتوزن و احیای تعداد سلولهای سرتولی و طبیعی شدن اندازه‌ی لوله‌های اسپرماتوزن و بهبود پارامترهای اسپرمی از جمله تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌ها نسبت به تیمارهای سایمتیدین بود و اثرات مخرب سایمتیدین را بر ضخامت لایه اپیتلیوم کم می‌کند. آپریوکو و همکاران در سال ۲۰۱۴ تأثیر ویتامین C را به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی بر روی اثرات مخرب سایمتیدین بر بیضه در موش صحرایی را بررسی کردند و نتایج آنها نشان داد که سایمتیدین بطور وابسته به دوز باعث کاهش معنی‌دار در تعداد و حرکت و زنده‌مانی اسپرم‌ها می‌شود. همچنین نتایج نشان داد که سایمتیدین باعث تغییرات معنی‌دار در بافت‌شناسی بیضه و کاهش معنی‌دار ضخامت اپیتلیوم لوله‌های سمینی فر و کاهش بلوغ سلول‌های اسپرماتوژنیک و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) می‌شود و ویتامین C باعث بهبود اختلال در عملکرد و شکل لوله‌های اسپرماتوزن و افزایش تعداد و حرکت اسپرم‌ها و بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود. همچنین بلترام و همکاران در سال ۲۰۱۷، تأثیرات ویتامین B12 در تعدیل تأثیرات منفی داروی سایمتیدین را بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) و تعداد اسپرم‌ها، اسپرماتوسیت، تعداد سلول‌های ژرمینه (Germinal cells) بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که رابطه معنی‌داری بین ویتامین B12 و بهبود پارامترهای اسپرم از جمله زنده‌مانی و تعداد و حرکت اسپرم‌ها، اسپرماتوزن و فعالیت آنزیم‌های آنتی

تستوسترون (۱۴)، کاهش وزن بیضه (۹)، از دست دادن سلول‌های بنیادی توسط فرایند آپوپتوز (۱۵)، و مرگ سلول‌های Peritubular myoid می‌شود (۲۱). تمامی موارد فوق‌الذکر، توان افزایش ریسک ناباروری را دارند. محققان برای کاهش تأثیرات استرس اکسیداتیو ناشی از مصرف سایمتیدین، از آنتی‌اکسیدانهای طبیعی مانند انواع ویتامینها (C, E) و سایر مواد طبیعی استفاده می‌کنند (۱۹)، (۲۰ و ۲۴). اخیراً در برخی از تحقیقات استفاده از مواد پروتئینی آبکافت شده طبیعی (Hydrolysate protein) یا پپتیدهای زیست‌فعال (Bioactive peptides) در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از برخی داروها گزارش شده است. پپتیدهای زیست‌فعال معمولاً دارای ۲ تا ۲۰ اسیدآمینه با وزن مولکولی ۲۰۰ تا ۱۸۰۰ دالتون هستند که در اثر هیدرولیز آنزیمی و یا تخمیر میکروبی از مواد پروتئینی مانند شیر، سویا و سایر ضایعات پروتئینی تولید می‌شوند (۱۳ و ۳۲). در کنار ارزش غذایی، اثرات شبه هورمونی و فیزیولوژیکی این مواد در بدن گزارش شده است که این اثرات بستگی به ترکیب و قرارگیری اسید آمینه در موقعیت N- و C- ترمینال، طول زنجیره پپتید، نوع بار اسیدهای آمینه تشکیل‌دهنده‌ی پپتید و خصوصیات آبگریز / هیدروفیل زنجیره آنها دارد (۲۳). از جمله اثرات پپتیدهای زیست‌فعال می‌توان به تأثیرات ضد فشارخون، آنتی‌اکسیدان، ضد سرطان، ضد میکروبی، همچنین تعدیل‌کننده‌ی سیستم ایمنی و کاهش کلسترول اشاره کرد (۶، ۱۶ و ۲۹). متأسفانه با توجه به مرور منابع، رفرنسی که در رابطه با تأثیرات پپتیدهای زیست‌فعال در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از سایمتیدین باشد یافت نشد. ولی با توجه به تأثیرات سایر آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مانند ویتامین‌ها و ... به برخی از نتایج آنها اشاره می‌شود. النیلی و همکاران در سال ۲۰۱۰ تأثیر استفاده از شیرهی گیاه *Nigella sativa* به همراه سایمتیدین را بر روی سیستم تولیدمثلی موش رت نر بررسی کردند و نتایج نشان داد که شیرهی این گیاه به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی

شده در دور ۱۰۰۰g برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. سوپرناتانت‌های حاصل سپس با یکدیگر جمع و توسط کاغذ واتمن فیلتر گردیده تا عصاره پپتیدی شفاف حاصل گردد. عصاره پپتیدی سپس با استفاده از خشک‌کن انجمادی خشک گردیده و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد برای استفاده‌های بعدی نگهداری شد. مقدار پروتئین عصاره پپتیدی به روش بیورت با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) تعیین گردید (۱۸).

پپتیدهای زیست‌فعال تهیه شده با روش فوق، در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن موش روزانه در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و از طریق گاوآژ وارد دستگاه گوارشی رت‌ها می‌شد. سایمتیدین مورد استفاده در این تحقیق از شرکت دارویی داروپخش تهیه شد و بعد از حل کردن در آب مقطر حاوی ۰/۵ درصد کربوکسی‌متیل سلولز سدیم (CMC= Sodium carboxymethyl cellulose) به صورت روزانه از طریق گاوآژ در موشها مورد استفاده قرار می‌گرفت (۳). لازم به ذکر است که در گروه کنترل به جای سایر مواد مورد استفاده، آب مقطر حاوی ۰/۵ درصد CMC گاوآژ شد.

جهت تعیین دوز دارو و پپتید، رت‌ها دوبار در هفته وزن کشی می‌شدند. بعد از اتمام دوره تیمار، موش‌ها با کلروفورم آسان‌کشی شدند و بیضه‌ها با رعایت شرایط استریل از داخل شکم خارج گردید. برای اینکار، پوست ناحیه شکمی رت‌ها توسط الکل اتانول ۷۰ درصد استریل و سپس در ناحیه شکم برشی ایجاد شد. بعد از جدا کردن بافت‌های همبندی اطراف، بیضه‌ها از بدن خارج شدند و دم اپیدیدیم بیضه‌ها به داخل محیط کشت mRIECM جهت ارزیابی پارامترهای اسپرمی انتقال داده شد. در نهایت بیضه‌ی چپ رت‌ها جهت تثبیت و کارهای بافتی به محلول فرمالین ۱۰ درصد منتقل گشت.

اکسیدانی و حفظ عملکرد طبیعی اسپرم در مردان در مقایسه با تیمارهای سایمتیدین وجود دارد. باتوجه به توضیحات داده شده در خصوص القای استرس اکسیداتیو بوسیله سایمتیدین و همچنین تأثیرات آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال که در مطالعات پیشین گزارش شده است، این مطالعه با هدف بررسی تأثیرات استفاده از سایمتیدین و تأثیرات تعدیل‌کنندگی ناشی از آن بوسیله پپتیدهای زیست‌فعال استخراج شده از ضایعات موتو ماهیان، طراحی و اجرا شد.

مواد و روشها

تعداد ۳۶ عدد رت نر نژاد ویستار سالم با وزن اولیه $±40$ گرم از خانه حیوانات گروه زیست‌شناسی دانشگاه ارومیه برای انجام تحقیق به ۶ قفس مربوطه منتقل شدند. رت‌ها در طول مدت آزمایش، در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد و رژیم نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با جیره استاندارد تغذیه شدند. بعد از دو هفته آدپتاسیون با شرایط آزمایش به شش گروه آزمایشی تقسیم و با تیمارهای تغذیه‌ای به صورت دهانی به مدت ۴۵ روز تغذیه شدند. تیمارهای آزمایشی به شرح زیر بودند: گروه C کنترل، گروه P ۲۰ میلی‌گرم پپتید به ازای هر کیلوگرم بدن، گروههای CIM40 و CIM120 به ترتیب ۴۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم سایمتیدین به ازای هر کیلوگرم بدن، گروه CIMP40 و CIMP120 به ترتیب ۴۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم سایمتیدین + ۲۰ میلی‌گرم پپتید به ازای هر کیلوگرم بدن.

برای تهیه پپتیدهای زیست‌فعال، از سس تخمیری مهباهو که از فروشگاه‌های محلی در بندر عباس خریداری شده بود استفاده شد. نمونه تهیه شده در آزمایشگاه با استفاده از خشک‌کن انجمادی خشک شد. قبل از آنالیز، عصاره پپتیدی از طریق حل نمودن ۱ قسمت پودر خشک شده با ۵ قسمت آب مقطر تهیه و مخلوط حاصل در حمام آبی با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت و نیم توسط هم‌زن الکتریکی بهم زده شد. در انتها، مخلوط به هم زده

کل اسپرم‌های متحرک در این ۱۰ میدان دید به عنوان درصد تحرک ثبت گردید (۲۸). برای ارزیابی درصد اسپرم‌های زنده، از رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین استفاده شد و درصد اسپرم‌های زنده (بی‌رنگ) و مرده (نارنجی تا قرمز) براساس متد Wyrobek و همکاران در سال ۱۹۸۳ محاسبه گردید.

محاسبات آماری: برای مقایسه داده‌های حاصل از تیمارها در انتهای دوره با تیمار کنترل، از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) برای داده‌های اندازه‌گیری شده و تست کروسکال والیس برای داده‌های شمارشی استفاده شد. قبل از اعمال تست‌های مذکور ابتدا داده‌ها از نظر نرمال بودن (تست Kolmogorov-Smirnov) و همگنی واریانسها (Levene test) بررسی شدند. برای رسم گرافها از نرم افزار Excell نسخه ۲۰۱۳ و برای بررسی تغییرات آماری در تیمارهای آزمایشی از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد.

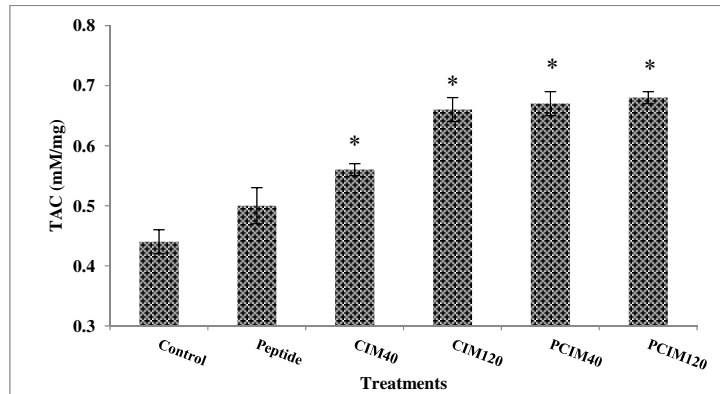
نتایج

نمودار ۱ نتایج بررسی ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی در بیضه-ها را نشان می‌دهد. براساس این نتایج استفاده از ترکیب پپتیدهای زیست‌فعال با سایمتیدین به طور معنی‌داری میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام را در مقایسه با تیمار کنترل افزایش می‌دهد ($P < 0.05$). همچنین این نتایج نشان داد که استفاده از سایمتیدین به صورت مجزا در هر دو غلظت باعث افزایش معنی‌دار ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی نسبت به تیمار کنترل می‌شود ($P < 0.05$).

از کیت سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (Navand (Salamat, Urmia, Iran) برای بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (Total antioxidant capacity) استفاده شد. این کیت، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیومولکول‌ها را، در نمونه‌های مختلف، براساس توانایی احیاءکنندگی آهن دو ظرفیتی و با مکانیسم انتقال الکترون اندازه‌گیری می‌کند. مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه یا محلول استاندارد را با یک میلی‌لیتر از محلول کارآماده شده مخلوط شد و پس از انجام ورتکس، در زمان‌های صفر و ۴ دقیقه در طول موج ۵۹۳ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد. و براساس پروتکل کیت دریافتی میزان TAC گزارش شد.

برای اندازه‌گیری قطر لوله‌های اسپرمی (STD) در بیضه و همچنین ضخامت لایه اپیتلیوم (ET)، نمونه‌های بافتی به مدت ۱۰-۷ روز در محلول فرمالین قرار داده شدند. پس از تثبیت نمونه‌ها مراحل مختلف پاساژ بافتی انجام داده شد. برای بررسی خصوصیات فیزیکی اجزاء سلولی و ارتباطات بافت‌ها، برش‌های مورد نظر با هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) رنگ آمیزی شدند. اما قبل از انجام رنگ آمیزی پارافین از مقطع روی اسلاید برداشته شده برای این منظور و آبدهی به بافت‌ها، اسلاید‌ها به ترتیب از محلول‌های مربوطه عبور داده شدند و برای ارزیابی قطر لوله‌های منی ساز و همچنین ضخامت لایه اپیتلیوم از روش Soudamani در سال ۲۰۰۵ استفاده شد.

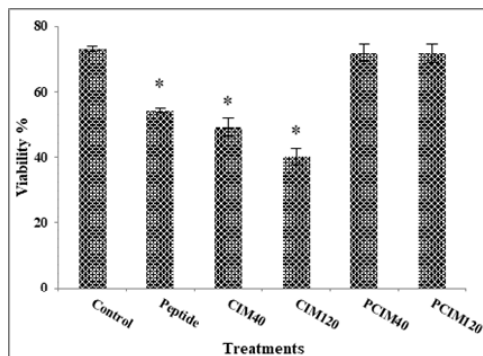
جهت تعیین درصد تحرک اسپرم‌ها، یک قطره از اسپرم‌های موجود در محیط کشت بر روی لام میکروسکوپی قرار داده شد و ۱۰ میدان دید میکروسکوپی با درشت‌نمایی ۴۰۰ برابر مورد بررسی قرارگرفت. سپس میانگین



نمودار ۱- تأثیرات استفاده از سایمتیدین و پپتیدهای زیست‌فعال بر ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در رت‌های نر نژاد ویستار
* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با تیمار کنترل در سطح اطمینان ۹۵ درصد است

اسپرما نسبت به تیمارهای سایمتیدین می‌شود ($P < 0.05$). همچنین نتایج نشان داد که استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال به صورت مجزا و سایمتیدین در غلظت ۴۰ میلی‌گرم باعث افزایش معنی‌دار تحرک اسپرما می‌شود ($P < 0.05$). در حالیکه استفاده همزمان از سایمتیدین با پپتیدها و همچنین غلظت بالای آن تأثیر معنی‌دار منفی بر تحرک اسپرما نمی‌گذارد.

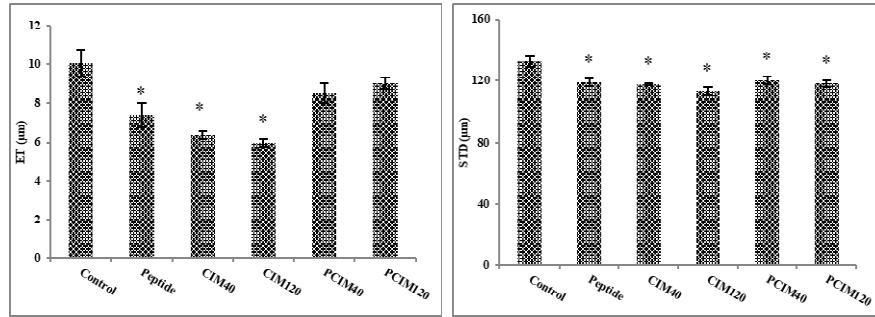
نمودار ۲ تأثیرات استفاده از تیمارهای غذایی بر شاخصهای اسپرمی را در مقایسه با تیمار کنترل نشان می‌دهد. براساس نتایج به دست آمده استفاده از سایمتیدین و همچنین پپتیدهای زیست‌فعال به صورت مجزا باعث کاهش معنی‌دار زنده‌مانی اسپرما نسبت به تیمار کنترل در رت‌های نر شد ($P < 0.05$). در حالیکه استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال همراه با سایمتیدین باعث افزایش معنی‌دار زنده‌مانی



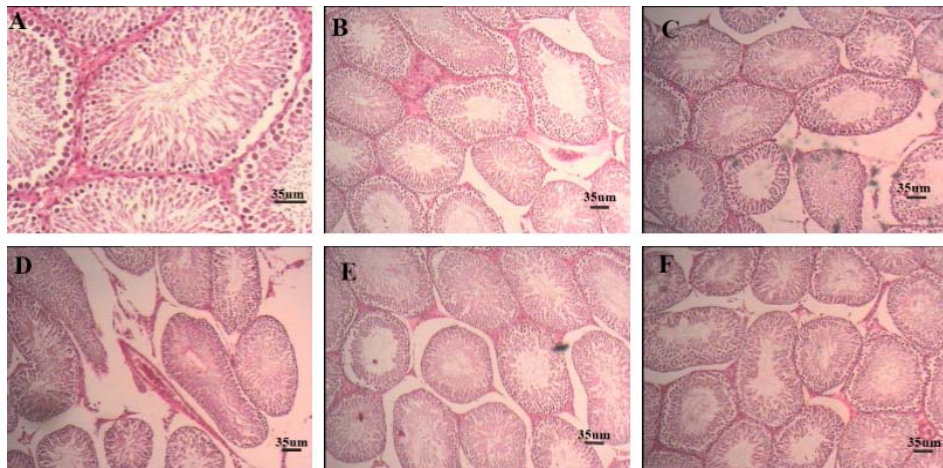
نمودار ۲- تأثیرات استفاده از سایمتیدین و پپتیدهای زیست‌فعال بر شاخصهای اسپرمی در رت‌های نر نژاد ویستار
* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با تیمار کنترل در سطح اطمینان ۹۵ درصد است

تیمارهای مجزای پپتیدهای زیست‌فعال و همچنین سایمتیدین میزان ET را به طور معنی‌داری نسبت به تیمار کنترل کاهش داد ($P < 0.05$). در حالیکه استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال در تیمارهای سایمتیدین میزان این شاخص را به طور معنی‌داری نسبت به تیمارهای سایمتیدین افزایش داد ($P < 0.05$).

نمودار ۳، نتایج تأثیرات پپتیدهای زیست‌فعال به همراه سایمتیدین و بطور مجزا بر شاخصهای بافتی بیضه و مقایسه این تیمارها با تیمار کنترل را نشان می‌دهد. براساس این نتایج، غلظتهای متفاوت سایمتیدین و همچنین پپتیدهای زیست‌فعال به طور معنی‌داری میزان شاخص STD را در بافت بیضه را، نسبت به تیمار کنترل کاهش دادند ($P < 0.05$). همچنین بر اساس این نتایج تغذیه با

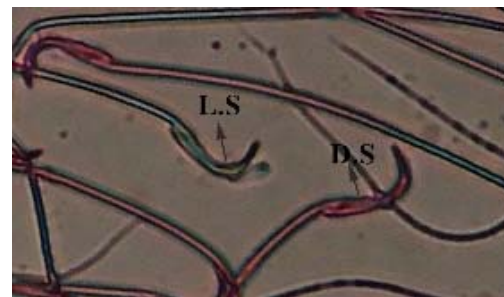


نمودار ۳- تأثیرات استفاده از سایمتیدین و پپتیدهای زیست‌فعال بر قطر لوله‌های اسپرماتوژنز (STD) (راست) و ضخامت لایه اپیتلیوم (ET) (چپ) در رت‌های نر نژاد ویستار (* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با تیمار کنترل در سطح اطمینان ۹۵ درصد است)



شکل ۱- مقطع عرضی بافت بیضه در گروه‌های کنترل (A)، پپتیدزیست‌فعال (B)، سایمتیدین ۴۰ (C)، سایمتیدین ۱۲۰ (D) و پپتید ۴۰+ (E)، سایمتیدین ۱۲۰+ پپتید (F) - (رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۱۰×)

طبیعی مانند ویتامین B12 (۱۱)، ویتامین C (۲۶) و میکروالمنتهایی مانند روی و سلنیوم (۱۷) استفاده می‌کنند. امروزه به تبع افزایش مصرف غذاهای دریایی، استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال با منشأ دریایی به عنوان یک فراورده مهم و یک آنتی‌اکسیدانت طبیعی در تحقیقات مختلف گزارش شده است. این فراورده‌ها از نظر ساختاری از ۲ تا ۲۲ اسید آمینه تشکیل شده‌اند. برخی از این اسیدهای آمینه مانند تریپتوفان، تیروزین، متیونین، سیستین، هیستامین و فنیل‌آلانین دارای خواص بالای آنتی‌اکسیدانی و فعالیت تمیزکنندگی (Scavenging activity) می‌باشند (۱۰ و ۲۳). بنابراین وجود خاصیت احیاءکنندگی و دارا بودن اسیدهای آمینه آنتی‌اکسیدانی می‌تواند ظرفیت مقابله با استرس را در بدن جانداران افزایش دهد. تأثیرات آنتی‌اکسیدانی



شکل ۲- تصاویر مربوط به رنگ‌آمیزی اتوزین-نگروزین جهت ارزیابی زنده‌مانی اسپرم-اسپرم مرده (DS)، اسپرم زنده (LS) - (بزرگنمایی ۱۰۰۰×).

بحث

امروزه برای کاهش یا تعدیل تأثیرات سوء داروهایی مانند سایمتیدین بر شاخصهای تولیدمثلی، از آنتی‌اکسیدانتهایی

پپتیدهای مورد استفاده در این تحقیق در کاهش رادیکالهای آزاد در رت‌های تحت استرس بی‌حرکتی (۱) و رت‌های تحت تیمار با آنتی‌بیوتیک افلوکساسین (۲) به اثبات رسیده است.

در مطالعه‌ی حاضر نتایج نشان داد که استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال به همراه داروی سایمتیدین در هر دو غلظت مورد مطالعه باعث افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) شد که نشان‌دهنده تأثیرات آنتی‌اکسیدانی این پپتیدها در کاهش اثرات مضر داروی سایمتیدین می‌باشد. طبق تحقیقات صورت گرفته توسط حیدری و همکاران در سال ۱۳۹۶ که در مورد تأثیرات پپتیدهای زیست‌فعال بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کبد در رت‌های تحت استرس بی‌حرکتی انجام شد نتایج آنها نشان داد که استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال باعث افزایش سطح TAC می‌شود. همچنین استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال باعث بهبود تنش اکسیداتیو ناشی از استرس بی‌حرکتی شد و سیستم ایمنی را نیز در کبد تقویت نمود. طبق نتایج بلترام و همکاران در سال ۲۰۱۷، استفاده از ویتامین B12 می‌تواند اختلال در آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بیضه ناشی از مصرف سایمتیدین از جمله افزایش سطح MDA و کاهش میزان فعالیت آنزیم‌های TAC و CAT را بهبود ببخشد. نتایج این تحقیق با نتایج مطالعات بلترام و همکاران (۲۰۱۷) و حیدری و همکاران (۱۳۹۶) در خصوص کاهش تأثیرات سوء سایمتیدین و کاهش این اثرات بوسیله آنتی‌اکسیدانهای طبیعی همخوانی دارد. همچنین نتایج تحقیقات نشان داد که به طور عجیبی استفاده از غلظت بالای این دارو باعث افزایش معنی‌دار در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام می‌شود. به نظر می‌رسد غلظت بالای این ماده با تأثیر و مصرف کامل آنزیم‌های متابولیزه‌کننده کبدی، باعث کاهش ماده موثره سایمتیدین در خون و در نتیجه تأثیرات سوء کمتر در برخی از ارگانها از جمله بیضه می‌شود که نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد.

النیلی و همکاران در سال ۲۰۱۰ تأثیر استفاده از شیره‌ی گیاه سیاه‌دانه (*Nigella sativa*) به همراه سایمتیدین را بر روی سیستم تولید مثلی موش رت‌نر بررسی کردند و نتایج نشان داد که شیره‌ی این گیاه به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت طبیعی آسیب‌های ناشی از سمیت مصرف طولانی مدت این دارو را بر تولید مثل جنس نر بهبود می‌دهد و باعث افزایش قطر لوله‌های اسپرماتوژنز (STD) و ضخامت لایه‌ی اپیتلیوم (ET) و پارامترهای اسپرمی از جمله تحرک اسپرم‌ها می‌شود. همچنین بلترام و همکاران در سال ۲۰۱۱ تأثیر ویتامین B12 را بر سایمتیدین در سیستم تولید مثلی رت‌نر بررسی کردند و نتایج نشان داد که مکمل ویتامین B12 قادر به تحریک اسپرماتوژنز، احیای تعداد سلولهای سرتولی، طبیعی شدن اندازه‌ی لوله‌های اسپرماتوژنز و بهبود پارامترهای اسپرمی از جمله تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌ها نسبت به تیمارهای سایمتیدین می‌شود. همچنین نتایج آنها نشان داد که استفاده از این شیره گیاهی اثرات مخرب سایمتیدین بر ضخامت لایه‌ی اپیتلیوم را کم می‌کند. همچنین آپریوکو و همکاران در سال ۲۰۱۴ تأثیر ویتامین C به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی را روی اثرات مخرب سایمتیدین بر بیضه در موش صحرایی را بررسی کرد و نتایج آنها نشان داد که سایمتیدین بطور وابسته به دوز باعث کاهش معنی‌دار در تعداد و حرکت و زنده‌مانی اسپرم‌ها می‌شود. براساس این نتایج، مصرف ویتامین C باعث افزایش تعداد و حرکت اسپرم‌ها می‌شود. آنوومن و همکاران در سال ۲۰۱۹ تأثیر عصاره‌ی استون (*C. Longa*) را بر سمیت ناشی از سایمتیدین بر محور هیپوفیز-بیضه بررسی کردن و نتایج تحقیق آنها نشان داد که این عصاره بخاطر داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود توانست سمیت شیمیایی ناشی از مصرف داروی سایمتیدین را برطرف سازد و میزان شاخص‌های اسپرمی از جمله حرکت اسپرم‌های بالغ را بهبود ببخشد. نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار با داروی سایمتیدین به مدت ۴۵ روز متوالی باعث اختلال در میزان شاخص‌های اسپرمی از

به مدت ۵۲ روز افزایش قابل توجهی در قطر لوله های منی ساز را نشان داد و حاکی از این بود که ویتامین B12 دارای اثر محافظتی علیه اثرات مخرب سایمتیدین بر شاخص های بافتی است. در مطالعه ی حاضر نتایج نشان داد که استفاده از پپتیدهای زیست فعال به همراه سایمتیدین باعث افزایش معنی دار قطر لوله های منی ساز (STD) و ضخامت لایه اپیتلیوم (ET) نسبت به تیمارهایی که از این ماده استفاده نکرده اند می شود. به نظر می رسد پپتیدهای زیست فعال با استفاده از خاصیت آنتی اکسیدانی خود که در مطالعات قبلی به اثبات رسیده است رادیکالهای آزاد حاصل از عملکرد سایمتیدین در بیضه را تعدیل و شرایط را برای عملکرد مناسب سلولهای منی ساز فراهم کرده اند. نتایج این تحقیق با مطالعات پیشین (۹، ۱۳ و ۱۸) در خصوص تأثیرات مثبت سایر آنتی اکسیدانت های طبیعی بر شاخصهای بافتی بیضه همخوانی دارد.

نتایج این تحقیق نشان داد که پپتیدهای زیست فعال استخراج شده از سس ساروغ که در جنوب کشور به عنوان یک فراورده غذایی مورد استفاده قرار می گیرد می تواند تا حدودی تأثیرات منفی ناشی از مصرف سایمتیدین را بر بافت بیضه و همچنین شاخصهای اسپرمی کاهش دهد و توان باروری در رت های نر را با توجه به نتایج این تحقیق افزایش دهد. تحقیقات بیشتر در مورد مکانیسم های دقیق این تأثیرات در پژوهشهای آینده مورد تاکید است.

جمله زنده مانی و حرکت اسپرمهای بالغ می شود. بر اساس این نتایج، در تیمارهایی که از پپتیدهای زیست فعال استفاده شده بود میزان شاخصهای فوق الذکر بهبود یافته بودند که نشان دهنده تأثیرات آنتی اکسیدانی این مواد در کاهش اثرات سوء سایمتیدین بر شاخصهای اسپرمی بود. نتایج این تحقیق با نتایج مطالعات النیلی و همکاران (۲۰۱۰)، بلترام و همکاران (۲۰۱۱)، آپریوکو و همکاران (۲۰۱۴) و آنوومن و همکاران (۲۰۱۹) در خصوص کاهش تأثیرات سوء سایمتیدین بوسیله ی آنتی اکسیدانت های طبیعی همخوانی دارد.

طبق نتایج آزمایشات آپریوکو و همکاران در سال ۲۰۱۴، سایمتیدین باعث تغییرات معنی دار در بافت شناسی بیضه و کاهش معنی دار ضخامت اپیتلیوم لوله های سمینی فر و کاهش بلوغ سلول های اسپرماتوزنیک می شود و ویتامین C باعث بهبود اختلال در عملکرد و شکل لوله های اسپرماتوزن می شود. همچنین براساس نتایج بلترام و همکاران در سال ۲۰۱۷، ویتامین B12 می تواند آسیب های بافتی بیضه ناشی از مصرف سایمتیدین از جمله افزایش قطر، فضای حفره لومن و کاهش سلول های سرتولی و دیگر شاخص های بافتی را بهبود ببخشد. السعد در سال ۲۰۱۸ تغییرات میکروسکوپی و فوق ساختاری ناشی از سایمتیدین و اثر ویتامین B12 به عنوان یک عامل محافظ در بیضه های موش را مورد ارزیابی قرارداد. نتایج در تیمارهای آزمایشی با سایمتیدین همراه با ویتامین B12

منابع

۲ - زارع، ز، حسین نجدگرمی، ا، و نیکو، م، ۱۳۹۸، بررسی تأثیرات پپتیدهای زیست فعال بر آنزیم های آنتی اکسیدانی بیضه و سمیت تولید مثلی حاصل از آنتی بیوتیک افلوکسازین در رت نر، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه ارومیه، صفحه ۴۰۹-۳۹۹.

۱ - حیدری، ش، حسین نجدگرمی، ا، و نیکو، م، ۱۳۹۵. تأثیر مخلوط پپتیدهای زیست فعال ماهی ساردین بر ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم، پراکسیداسیون چربیها و فراسنجه های خونی در موش های بزرگ آزمایشگاهی و استار تحت استرس بی حرکتی، مجله پژوهشهای جانوری (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۳۰، شماره ۳، صفحه ۲۸۸-۲۷۹.

- 3- Abd-Allah, A. R. A., & Aly, H. (2000). Adverse testicular effects of some quinolone members in rats. *Pharmacological research*, 41(2), 211-219.
- 4-Al-Nailey, KG Ch. (2010). Study of the protective effect of *Nigella sativa* against Cimetidine induced reproductive toxicity in male mice. *Al-Qadisiyah Journal of Veterinary Medicine Sciences*, 9, 55-62.
- 5-Aprioku, J., Ibeachu, C., & Ijeomah, M. (2014). Protective Effect Of Ascorbic Acid On Cimetidine-Induced Reproductive Toxicity In Male Wistar Rats. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 9(1), 46-54.
- 6-Arihara, K. (2006). Functional properties of bioactive peptides derived from meat proteins. *Advanced technologies for meat processing*, 245-274.
- 7-Beltrame, F. L., & Sasso-Cerri, E. (2011). Vitamin B12 supplement exerts a beneficial effect on the seminiferous epithelium of cimetidine-treated rats. *Cells Tissues Organs*, 193.
- 8-Beltrame, F. L., & Sasso-Cerri, E. (2017). Vitamin B12-induced spermatogenesis recovery in cimetidine-treated rats: effect on the spermatogonia number and sperm concentration. *Asian journal of andrology*, 19(5), 567.
- 9-Chung, K. W., Dressler, J. B., Halterman, M. W., & Allison, J. E. (1984). Structural and functional abnormality of ectopic testes in rats. *Life Sciences*, 34(20), 1953-1957.
- 10-Davalos, & Miguel. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67, 1939-1944.
- 11-Ebadimanas, & Najafi. (2017). Protective effects if royal jelly on the histomorphologic oxidative stress and sperm parameters in Ofloxacin treated rat. *Comparative clinical pathology*.
- 12-Elsaed, W. M., Bedeer, R. F., & Eladl, M. A. (2018). Ameliorative effect of vitamin B12 on seminiferous epithelium of cimetidine-treated rats: a histopathological, immunohistochemical and ultrastructural study. *Anatomy & cell biology*, 51(1), 52-61.
- 13-Erdmann, K., Cheung, B. W., & Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of nutritional biochemistry*, 19(10), 643-654.
- 14-Fawcett, D. W., Neaves, W. B., & Flores, M. N. (1973). Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of reproduction*, 9(5), 500-532.
- 15-Franca, L. R., Parreira, G. G., Gates, R. J., & Russell, L. D. (1998). Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: quantitation of germ-cell population and effect of elimination of residual testosterone after long-term hypophysectomy. *Journal of Andrology*, 19(3), 335-340.
- 16-Giri, A., & Ohshima, T. (2012). Bioactive marine peptides: Nutraceutical value and novel approaches *Advances in food and nutrition research* (Vol. 65, pp. 73-105): Elsevier.
- 17-Goel, A., Dani, V., & Dhawan, D. (2005). Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 156(2-3), 131-140.
- 18-Gornal, A., Bardawill, C., & David, M. (1949). Protein-Biuret colorimetric method. *J. Biol. Chem*, 177, 751.
- 19-Hajihashemil. (2017). effects of cobalamin (vitamin B12) on gentamicin induced nephrotoxicity in rat. *Drug research(stuttg)*, 67, 710.
- 20-Khajehei. (2009). Randomised double-blind trial of the effect of vitamin C on dyspareunia and vaginal discharge in women receiving doxycycline and triple sulfa for chlamydial cervicitis. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 49, 525.
- 21- Kurohmaru, M., Hikim, A. P. S., Mayerhofer, A., Bartke, A., and Russell, L. D., 1990. Golden hamster myoid cells during active and inactive states of spermatogenesis: correlation of testosterone levels with structure, *American Journal of Anatomy*, 188(3), PP: 319-327.
- 22-Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Jridi, M., Toldrà, F., Aristoy, M. C., & Nasri, M. (2015). Characterization and comparative assessment of antioxidant and ACE inhibitory activities of thornback ray gelatin hydrolysates. *Journal of functional foods*, 13, 225-238.
- 23-Li, Y., & Yu, J. (2015). Research progress in structure-activity relationship of bioactive peptides. *Journal of medicinal food*, 18(2), 147-156.
- 24-Manali, P. (2011). Evaluation of vitamin E and N-acetyl cysteine in gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Renal Failure*, 10, 1171-1188.

- 25-Onwuemene1, N., Eseigbe Imafidon, CH., Oladele Ayoka1, A., 2019. Curcuma longa normalized cimetidine-induced pituitary-testicular dysfunction: Relevance in nutraceutical therapy. *Animal Model Exp Med*, 2, 191-200.
- 26-Raji, Y., Kunle-Alabi, O. T., Olaleye, S., Gbadegesin, M., Awobajo, F., Osonuga, O., Odukanimi, A., Salami, S., Bolarinwa, A. F. (2007). Impact of α -tocopherol on metronidazole and tetracycline-induced alterations in reproductive activities of male albino rats. *J Bio Sci*, 7(1), 41-46.
- 27-Russell, L. D., Ettlin, R. A., Hikim, A. P. S., & Clegg, E. D. (1993). Histological and histopathological evaluation of the testis. *International journal of andrology*, 16(1), 83-83.
- 28-Selvakumar, E., Prahalthan, C., Sudharsan, P. T., & Varalakshmi, P. (2006). Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. *Toxicology*, 217(1), 71-78.
- 29-Shahidi, F., & Zhong, Y. (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, 91(4), 914-931.
- 30-Shuai, W., Yong-rui, B., Yun-Peng, D., Xian-Sheng, M., & Ting-Guo, K. (2011). Evaluation of gastric ulcer model based on gray-scale image analysis. *African Journal of Microbiology Research*, 5(11), 1285-1290.
- 31-Soudamani, S., Malini, T., & Balasubramanian, K. (2005). Effects of streptozotocin-diabetes and insulin replacement on the epididymis of prepubertal rats: histological and histomorphometric studies. *Endocrine research*, 31(2), 81-98.
- 32-Taheri A, S. F. K., Jacobsen C, Baron CP. (2014). Antioxidant activities and functional properties of protein and peptide fraction isolated from salted herring brin. *Food Chemistry*, 142, 318-326.
- 33-Wyrobek, A. J., Gordon, L. A., Burkhart, J. G., Francis, M. W., Kapp Jr, R. W., Letz, G., Malling, H. V., Tophan, J. C., Whorton, M. D. (1983). An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 115(1), 1-72.

Protective effects of Bioactive peptides on sperm characteristics and testis tissue in Cimetidine treated male rats

Ahmadi Z.¹, Najdegerami E.H.^{1*}, Nejati V.¹, Najafi Gh.R.² and Niko M.³

¹ Dep. of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

² Dept. of Basic science, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

³ Artemia & Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

Abstract

Based previous studies, long term using of Cimetidine increases stress oxidative resulting infertility. In this study, protective effects of bioactive peptides extracted from Anchovy wastes on total antioxidant capacity, sperm parameters, sperm tubular diameters, epithelium thickness (ET) and DNA damage in Cimetidine treated rats was investigated. Thirty-six healthy male rats (200±40) were randomly assigned to 6 cages and fed with experimental diets (Control, 20mg bioactive peptide P, 40 mg Cimetidine CIM40, 120 mg Cimetidine CIM40, CIM40+P, CIM120+P) for 45 days. The results showed that the rat fed on Cimetidine treatments and Cimetidine + peptide had significant higher TAC then the control (P<0.05). Also, based on these results, a significant decrease was observed in the rats fed on CIM40, 120 in case of sperm viability and epithelium thickness (P<0.05), while the using of bioactive peptides increased these values which had no significant difference with control (P>0.05). It seems, bioactive peptide has an antioxidant effects on sperm parameters and testis tissue in Cimetidine treated rats and decrease infertility risk.

Key word: Bioactive peptides, Cimetidine, anchovy, infertility, oxidative stress