

## مطالعه ارزیابی هورمون تستوسترون و شاخص‌های اسپرماتوژنز در موش‌های صحرایی دیابتی تحت تیمار عصاره‌ی آبی زعفران (*Crocus Sativus* L.)

فرید پورصادقی<sup>۱</sup>، احمدعلی محمدپور<sup>۱\*</sup> و زهرا موسوی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه

<sup>۲</sup>ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۶

### چکیده

مطالعات پیشین نشان می‌دهد که ترکیبات گیاهی می‌توانند در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله دیابت موثر باشند. دیابت یک بیماری متابولیکی جدی است که می‌تواند باعث اختلال در عملکرد طبیعی سیستم تناسلی شود. به همین منظور، تاثیر عصاره‌ی آبی زعفران بر سطح هورمون تستوسترون و شاخص‌های اسپرماتوژنز در موش‌های صحرایی دیابتی شده‌ی نژاد ویستار مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۳۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به ۵ گروه ۷ تایی تقسیم شدند. جهت القای دیابت از داروی استرپتوزوتوسین به میزان ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استفاده شد. جهت ارزیابی اثر عصاره‌ی زعفران، درمان حیوانات به مدت ۳۵ روز ادامه پیدا کرد. متعاقب پایان یافتن دوره‌ی درمان، حیوانات توسط بیهوشی عمیق آسان‌کشی شدند. نمونه‌ی خون جهت اندازه‌گیری سطح سرمی تستوسترون، جمع‌آوری شد. سپس، نمونه برداری از بافت بیضه انجام شد و مراحل روتین آماده‌سازی مقاطع بافتی انجام پذیرفت. در نهایت نمونه‌ها، جهت ارزیابی‌های هیستومورفومتریک بیضه آماده شدند. علاوه بر اینها شاخص‌های تمایز لوله‌ای و شاخص اسپرمیوژنز محاسبه گردید. همچنین تحرک و زنده‌مانی اسپرمها، بررسی شد. نتایج نشان داد که، در گروه دیابتی ضخامت اپی‌تلیوم و قطر لوله‌های اسپرم‌ساز کاهش یافته بود و عصاره‌ی زعفران با دوزهای ۱۲۰ و ۲۴۰ میلی‌گرم سبب بهبود آسیب حاصله شده بود. دیابت سبب کاهش سطح تستوسترون سرمی شده بود که عصاره‌ی زعفران خصوصاً با دوز ۱۲۰ میلی‌گرم سبب افزایش قابل توجه این هورمون شده بود. مشاهدات نشان داد که، عصاره‌ی زعفران بدلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند باعث کاهش اثرات منفی دیابت بر روی بافت بیضه و خصوصیات هیستومورفومتریک آن شود.

واژه‌های کلیدی: هیستومورفولوژی، عصاره‌ی آبی زعفران، دیابت، بیضه، شاخص‌های اسپرماتوژنز، موش صحرایی

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: mohammadpoor@um.ac.ir

### مقدمه

توقع که در غالب مناطق بصورت طبیعی و در برخی دیگر از مناطق بد آب و هوا در شرایط کنترل شده بصورت کشت گلخانه‌ای قابل کاشت می‌باشد. زعفران حاوی ۲۸ ترکیب آلی فرار می‌باشد که در حضور عوامل اکسایش مثل نور و هوا به سادگی تخریب می‌شود. به همین دلیل بایستی در ظروف دربسته و به دور از نور خورشید نگهداری شود (۱۵). علاوه بر آن، دیابت شایع‌ترین بیماری غدد درون‌ریز بدن

با توجه به عوارض جانبی بسیاری از داروهای شیمیایی، استفاده از ترکیبات طبیعی و گیاهان دارویی در طب مدرن رواج بیشتری یافته است و مطالعات فراوانی در راستای کشف و معرفی افزودنی‌های ایمن تر بویژه با منشأ گیاهی در سالهای اخیر انجام شده است (۱۳ و ۱۴ و ۷). یکی از این ترکیبات گیاهی، زعفران یا زرپران (*Crocus Sativus* L.) است که از تیره‌ی زنبقیان بوده و گیاهی است بسیار منعطف و کم

است که با عوارض شدید عملکردی و ساختاری همراه است (۱۷). دیابت اثرات نامطلوبی بر روی اندامها و بافت‌های بدن از جمله سیستم تناسلی دارد (۹). استرس اکسیداتیو نقش موثری در بیماری‌زایی دیابت و عوارض ناشی از آن دارد (۳). بنابراین با توجه به تاثیر منفی دیابت روی سیستم تناسلی و اثرات مثبت گیاهان دارویی روی دیابت، در این پژوهش ما بر آن شدیم که اثرات عصاره‌ی آبی زعفران بدلیل داشتن ترکیبات طبیعی و دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، بر روی بافت بیضه و سطح هورمون تستوسترون سرمی را مورد بررسی و آنالیز دقیق قرار دهیم.

### مواد و روشها

**حیوانات:** در این پژوهش ۳۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن  $150 \pm 20$  گرم مورد آزمایش قرار گرفت. حیوانات از مرکز نگهداری و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه تهیه و در قفس‌های مخصوص در ۵ گروه ۷ تایی نگهداری شدند. حیوانات توسط پلت تغذیه و جهت آبدهی از شیر آب شهری استفاده شد. حیوانات در دمای  $22 \pm 2$  و تحت شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و رطوبت نسبی ۶۸-۵۰ درصد نگهداری شدند. قبل از تزریق استرپتوزوتوسین و خون‌گیری، حیوانات شبانه در گرسنگی، قرار گرفتند در حالیکه دسترسی آزاد به آب داشتند. قبل از شروع آزمایش، موش‌های صحرایی نر بالغ به مدت ۱۴ روز در مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه در کنار هم بصورت گروه بندی شده قرار داده شدند تا با شرایط محیطی سازش پیدا کرده و استرس‌های محیطی بر نتیجه آزمایش‌ها تاثیری نداشته باشد.

تمام مراحل انجام این طرح طبق موازین اخلاقی کمیته حمایت از حیوانات دانشگاه فردوسی مشهد صورت گرفت (کد مصوبه اخلاق IR.UM.REC.1401.019)

**القای دیابت:** جهت القای دیابت از داروی استرپتوزوتوسین (سیگما آلدردج، ایالات متحده آمریکا) به میزان ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم حل شده در محلول سیترات

بافر با PH:۴/۵ بصورت تزریق داخل صفاقی (IP) استفاده شد. پس از ۴۸ ساعت، خون‌گیری از طریق ورید دمی صورت گرفت و خون تهیه شده جهت اندازه‌گیری سطح سرمی گلوکز استحصال گردید. لازم به ذکر است که میزان گلوکز یا قندخون ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر یا بالاتر از آن، القای موفقیت‌آمیز دیابت را اثبات میکند. علاوه بر آن، پرنوشی، تکرر ادرار و کاهش ناگهانی وزن و بیحالی هم در موش‌های صحرایی اتفاق می‌افتد.

**تهیه‌ی عصاره‌ی آبی زعفران:** برای تهیه‌ی عصاره‌ی آبی زعفران، مقدار ۲۵ گرم عصاره از مرکز رشد فرآورده‌های دارویی شرکت پویش داروی سینا تهیه گردید.

**گروه بندی حیوانات:** پس از اطمینان از دیابتی شدن حیوانات و تعیین دز موثر عصاره‌ی آبی زعفران در حیوانات، ابتدا آنها را در ۵ گروه ۷ تایی تقسیم بندی کردیم و در طول دوره‌ی آزمایش که ۳۵ روز تعیین شد، عملیات بشرح زیر انجام شد:

گروه ۱ یا کنترل (Control): این گروه از حیوانات بعنوان شاهد آزمایش در نظر گرفته شده و در طول مدت زمان آزمایش حجم مشخصی از آب مقطر را به روش گاواژ دریافت کرد و با حرف N نشان داده شده است.

گروه ۲ یا دیابتی (Diabetic Group): این گروه از حیوانات توسط استرپتوزوتوسین دیابتی شده و روزانه حجم مشخصی از آب مقطر را دریافت کردند و با حرف NC نشان داده شده است.

گروه ۳ دیابتی و درمان با دوز کم از عصاره‌ی آبی زعفران (Diabetic + low dose aqueous saffron extract): این گروه از حیوانات که دیابتی شده هستند روزانه ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره‌ی آبی زعفران به صورت گاواژ دریافت کردند و با عدد 60 نشان داده شده است.

گروه ۴ دیابتی و درمان با دوز متوسط از عصاره‌ی آبی زعفران (Diabetic + intermediate dose aqueous saffron)

extract: این گروه از حیوانات که دیابتی شده هستند روزانه ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره‌ی آبی زعفران بصورت گاوآژ دریافت کردند و با عدد 120 نشان داده شده است.

گروه ۵ دیابتی و درمان با دوز بالا از عصاره‌ی آبی زعفران (Diabetic + high dose aqueous saffron extract): این گروه از حیوانات که دیابتی شده هستند روزانه ۲۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره‌ی آبی زعفران بصورت گاوآژ دریافت کردند و با 240 نشان داده شده است.

**آنالیز سرمی تستوسترون:** متعاقب پایان یافتن دوره درمان با عصاره‌ی آبی زعفران، حیوانات از محل نگهداری به آزمایشگاه منتقل و توسط بیهوشی عمیق آسان‌کشی شدند. نمونه‌های خون توسط سرنگ ۵ سی‌سی استریل با توجه به ناحیه توپوگرافیک قلب، مستقیماً از قلب جمع‌آوری شد. سپس به منظور استحصال سرم، نمونه‌های خون با ۳۰۰۰ RPM به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سرم‌های بدست آمده در داخل میکروتیوب قرار داده شده و در دمای ۲۰- درجه فریز شدند تا برای انجام آزمایش اندازه‌گیری هورمون تستوسترون نگهداری شوند. جهت سنجش هورمون تستوسترون از کیت Monobind, Inc-Iran استفاده شد.

**نمونه برداری و تهیه‌ی لام بافتی:** بیضه‌های حیوانات با رعایت اصول بهداشتی، پس از ایجاد برش در دیواره‌ی شکم، خارج و پس از جداسازی بافت‌های اطراف، وزن شدند و با نرمال سالین شسته شدند. سپس بیضه‌ها پس از تثبیت در محلول فرمالین ۱۰ درصد جهت تهیه مقاطع بافتی به منظور هیستومورفولوژی و آسیب‌شناسی بررسی شدند. نمونه‌های فیکس شده با استفاده از روش‌های معمول بافت‌شناسی پس از عبور از محلول‌های دستگاه آماده‌سازی بافت با استفاده از پارافین قالب‌گیری شدند. بلوک‌های بافتی با ضخامت ۵ میکرون توسط دستگاه میکروتوم برش داده شدند و رنگ آمیزی نمونه‌های بافتی توسط رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین صورت پذیرفت. همچنین به منظور

بررسی مکانیسم اثر دیابت بر روی بافت بیضه و چگونگی اثر درمانی عصاره‌ی آبی زعفران بر روی دیابت، ارزیابی‌های هیستومورفومتریک بیضه نظیر قطر لوله‌ی اسپرم‌ساز، قطر لومن و ضخامت اپی‌تلیوم زایشی در گروه‌های مختلف انجام شد. در این تحقیق، قطر ۱۰۰ لوله اسپرم‌ساز، لومن و ضخامت اپی‌تلیوم زایشی آن بصورت تصادفی، با استفاده از روش میکرومتری اندازه‌گیری و سپس میانگین پارامترها در بین گروه‌ها مقایسه شد.

**ارزیابی شاخص‌های اسپرماتوزن:** همچنین برای بررسی دقیق‌تر اثرات دیابت بر روی بافت بیضه و اثرات درمانی عصاره‌ی آبی زعفران بر روی دیابت، شاخص‌های تمایز لوله‌ای (TDI) که بیانگر درصد لوله‌های اسپرم‌سازی است که دارای سه یا بیشتر از سه رده سلول اسپرماتوزن تمایز یافته از سلول اسپرماتوگونی A می‌باشد، شاخص اسپرمیوزن (SI) که بیانگر نسبت لوله‌هایی که دارای اسپرم است به لوله‌هایی که فاقد اسپرم است، محاسبه گردید.

**ارزیابی اسپرم:** به منظور پی بردن به اثر دیابت و اثرات درمانی عصاره‌ی آبی زعفران بر روی تحرک، زنده‌مانی اسپرم، ناحیه‌ی دمی مجرای اپیدیدیم راست جهت آنالیز اسپرمی جدا و پس از ایجاد یک برش در روی آن، در محیط کشت تهیه شده در پتری دیش، به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. اسپرم‌ها از اپیدیدیم خارج گردیده و با نسبت ۱ به ۲۰ رقیق شدند. لازم به ذکر است، بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی، جهت بررسی حرکات اسپرم و تعداد اسپرم از لام نئوبار استفاده شد.

**تحرک اسپرم:** فقط اسپرم‌هایی که حرکت مستقیم و پیش‌رونده دارند از لحاظ باروری دارای اهمیت هستند. اسپرم‌ها بر اساس سرعت حرکت در میدان میکروسکوپی با درشتنمایی بالا (High power field/hpf) به چهار کلاس تقسیم می‌شوند.

۱. اسپرم‌های دارای حرکت سریع و پیش‌رونده (Rapid progressive): که سرعت حرکت اسپرم بیش از ۲۵

میکرومتر بر ثانیه است که به آن کلاس a نیز گفته می‌شود.

۲. اسپرم‌های دارای حرکت کند و پیشرونده (Slow progressive): سرعت حرکت آنها ۵ الی ۲۵ میکرومتر بر ثانیه است و به این دسته کلاس b نیز گفته می‌شود.

۳. اسپرم‌های متحرک ولی غیر پیشرونده (Non progressive): اسپرم‌هایی که در جای خود حرکت میکنند و یا دارای سرعت کمتر از ۵ میکرومتر بر ثانیه هستند که به این دسته کلاس c نیز گفته می‌شود.

۴. اسپرم‌های غیر متحرک (Immotile): اسپرم‌هایی که به طور کامل بی‌حرکت هستند و به آنها کلاس d گفته می‌شود. برای تعیین درصد اسپرم‌های متحرک، تعداد ۱۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده را به لام نئوبار توسط سمپلر تزریق کرده و پس از شمارش ۲۰۰ اسپرم درصد اسپرم‌های متحرک بین آنها را بدست آوردیم.

علاوه بر این برای تعیین میزان زنده مانی اسپرم‌ها از رنگ آمیزی اختصاصی اتوزین-نکروزین استفاده گردید که اصول کار در این رنگ آمیزی بر این مبنا استوار است که، در اثر آسیب به غشای پلاسمایی، اسپرم‌ها نسبت به رنگ مذکور نفوذپذیر می‌شوند. بدین منظور ابتدا نسبت یک حجم سوسپانسیون اسپرم و دو حجم اتوزین، در میکروتیوب مخلوط و پس از ۳۰ ثانیه نگهداری در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حجم مساوی از محلول نکروزین به آن اضافه شد و گسترش نازکی از نمونه بر روی لام ایجاد گردید. پس از خشک شدن گسترش، با استفاده از میکروسکوپ معمولی با عدسی ۱۰۰X تعداد ۱۰۰ اسپرم شمارش شد و نسبت درصد اسپرم در گروه‌های مختلف محاسبه گردید. در این رنگ آمیزی، سر اسپرم‌های زنده، سفید و سر اسپرم‌های مرده، قرمز رنگ می‌شود.

**آنالیز داده‌ها:** در نهایت داده‌های حاصل از مطالعات مورفولوژی و هیستومورفومتری به روش آماری ANOVA و تست تعقیبی دانکن با استفاده از نرم افزار SPSS مورد ارزیابی قرار گرفت.

## نتایج

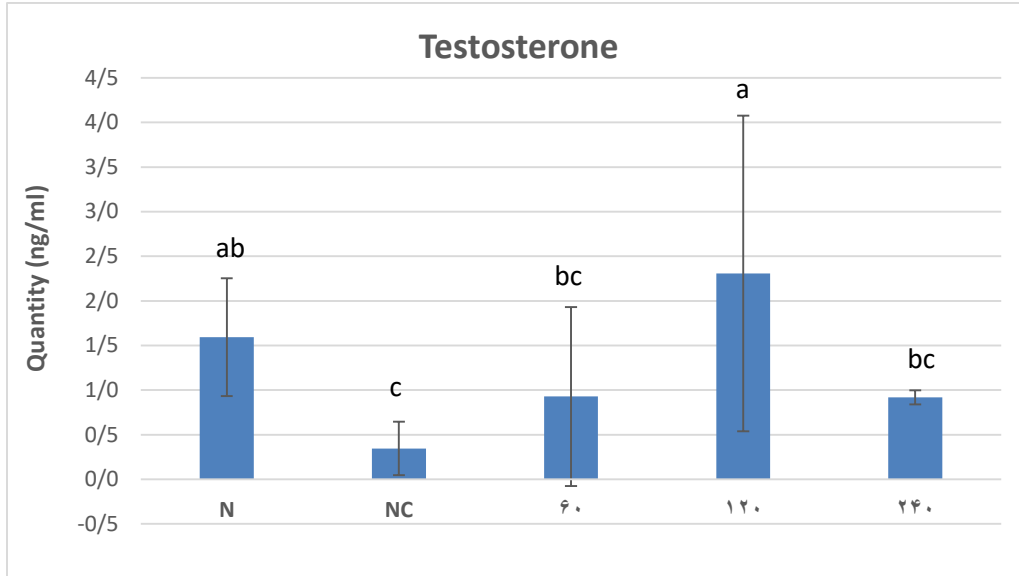
**سطح تستوسترون:** آنالیز مطالعه پیش رو نشان داد دیابت سبب کاهش قابل توجه سطح تستوسترون سرمی می‌شود که یکی از علت‌های آن را می‌توان به کاهش سلول‌های لیدیک بافت بیضه نسبت داد. مطابق نمودار شماره ۱، متعاقب درمان با عصاره‌ی آبی زعفران، افزایش در سطح سرمی تستوسترون را شاهد بودیم که در گروه درمان با دوز ۱۲۰ نسبت به بقیه‌ی گروه‌های درمان، سطح تستوسترون سرمی افزایش قابل توجهی دارد.

**ارزیابی‌های هیستومورفومتریک بافت بیضه: میانگین قطر لوله‌ی اسپرم‌ساز:** مقایسه ارزیابی هیستومورفومتریک در بین گروه‌های مورد آزمایش بیانگر این نکته است که دیابت

سبب کاهش میانگین قطر لوله‌ی اسپرم‌ساز شده است که متعاقب درمان با عصاره‌ی آبی زعفران، میانگین قطر لوله‌ی اسپرم‌ساز بتدریج افزایش می‌یابد.

**میانگین قطر لومن لوله‌های اسپرم‌ساز:** مقایسه‌ی قطر لومن بین گروه‌های مورد آزمایش، تایید کرد که دیابت باعث کاهش قطر لومن لوله‌های اسپرم‌ساز در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. همچنین مشاهده شد درمان با عصاره‌ی آبی زعفران با دوز کم و متوسط (۶۰ و ۱۲۰) نمی‌تواند تاثیر قابل چشمگیری روی قطر لومن لوله‌های اسپرم‌ساز بگذارد.

**میانگین ضخامت اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز:** نهایتاً آخرین ارزیابی هیستومورفومتریک در مطالعه ما، نشان داد دیابت سبب کاهش ضخامت اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز می‌شود که متعاقب درمان با عصاره‌ی آبی زعفران، ضخامت اپی‌تلیوم لوله‌ها بصورت تدریجی افزایش می‌یابد (جدول شماره ۱ و تصاویر ۱ تا ۵).

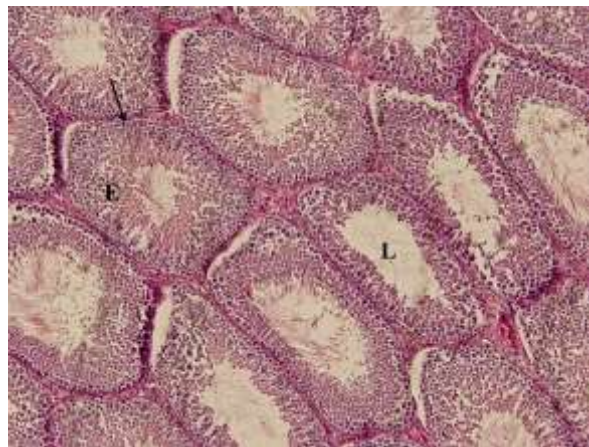


نمودار ۱: مقایسه هورمون تستوسترون در گروه‌های مختلف موش صحرائی (هر گروه ۷ عدد) بر حسب نانوگرم بر میلی لیتر -N گروه نرمال، -NC گروه دیابتی، -60 گروه درمان (دوز ۶۰ میلی گرم)، -120 گروه درمان (دوز ۱۲۰ میلی گرم)، -140 گروه درمان (دوز ۱۴۰ میلی گرم). \*ستون‌هایی که حروف آنها ناهمسان است اختلاف آنها معنی‌دار می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ).

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار ارزیابی‌های هیستومورفومتریک بافت بیضه در گروه‌های مختلف موش صحرائی (هر گروه ۷ عدد) بر حسب

میکرون

پارامتر اندازه‌گیری شده	کنترل	دیابتی شده	درمان با دوز ۶۰	درمان با دوز ۱۲۰	درمان با دوز ۲۴۰
میانگین قطر لوله اسپرم ساز	276/66 ± 18/9	240/18 ± 28/5	246/76 ± 17/9	260/55 ± 16/2	283/12 ± 16/7
میانگین قطر لومن لوله اسپرم ساز	151/64 ± 22/3	138/15 ± 21/2	119/32 ± 18/4	133/77 ± 9/5	141/34 ± 19/3
میانگین ضخامت اپی‌تلیوم لوله اسپرم ساز	90/11 ± 6/1	76/89 ± 7/3	80/67 ± 9/6	90/11 ± 5/5	94/88 ± 10/6



تصویر ۱: مقطع بافتی بیضه موش صحرائی در گروه کنترل، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین،  $\times 200$

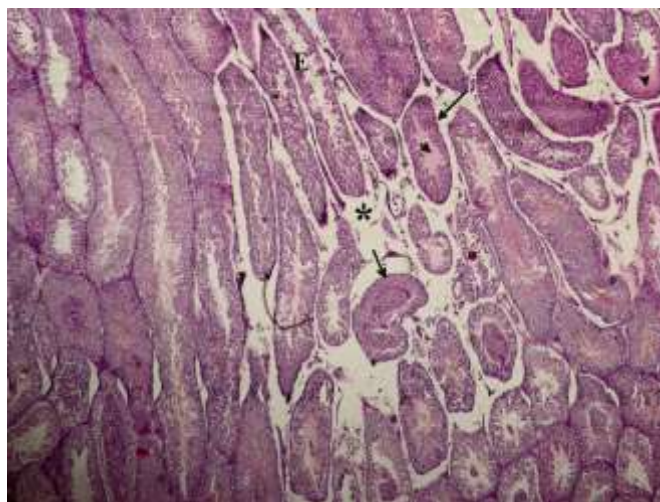
لوله‌های اسپرم ساز (نوکلئوس فلش)، لومن (L)، اپیتلیوم (E).

## ارزیابی شاخص‌های اسپرماتوژنز

## شاخص تمایز لوله ای (Tubular Differentiation Index (TDI

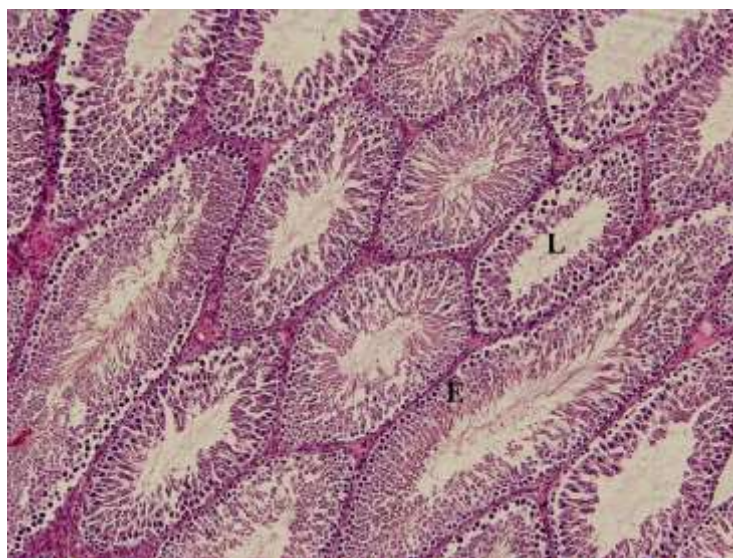
Index): مطالعات ما نشان داد دیابت بطور قابل ملاحظه‌ای شاخص تمایز لوله ای را تحت تاثیر قرار می‌دهد و درصد لوله

هایی که هر سه یا بیشتر از سه رده سلوهای اسپرماتوژنز تمایز یافته از سلول اسپرماتوگونی A را دارند، کاهش قابل توجهی دارند. همچنین مشاهدات ما حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه دیابتی با گروه‌های تحت درمان و کنترل است ( $P \leq 0.05$ ) (جدول و نمودار ۲).

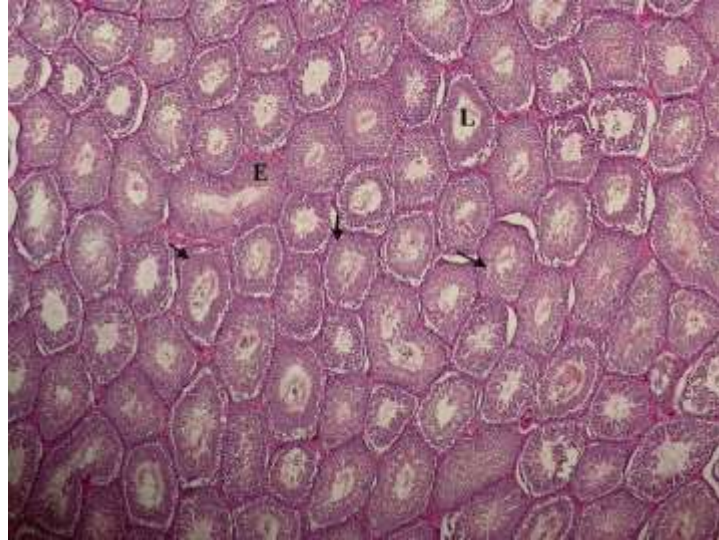


تصویر ۲: مقطع بافتی بیضه موش صحرایی در گروه دیابتی، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین،  $\times 100$

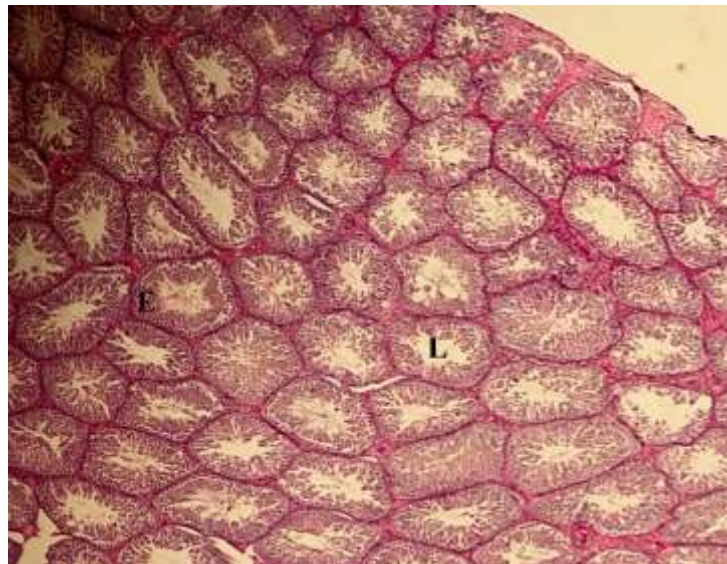
لوله‌های اسپرم ساز تغییر شکل یافته (نوک فلش‌ها)، لومن حاوی ترشحات (سرفلش‌ها)، اپیتلیوم تخریب شده (E)، بافت همبند گسترده در بین لوله‌ها (\*).



تصویر ۳: مقطع بافتی بیضه موش صحرایی در گروه دیابتی درمان شده با دوز ۶۰ میلی‌گرم عصاره آبی زعفران، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین،  $\times 200$ ، لومن (L)، اپیتلیوم (E).



تصویر ۴: مقطع بافتی بیضهٔ موش صحرائی در گروه دیابتی درمان شده با دوز ۱۲۰ میلی گرم عصارهٔ آبی زعفران، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین،  $\times 100$ ، لومن (L)، اپیتلیوم (E)، فلش‌ها تراکم لوله‌های اسپرم ساز را با اپیتلیوم سالم نشان می‌دهند



تصویر ۵: مقطع بافتی بیضهٔ موش صحرائی در گروه دیابتی درمان شده با دوز ۲۴۰ میلی گرم عصارهٔ آبی زعفران، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین،  $\times 100$ ، لومن (L)، اپیتلیوم (E).

جدول ۳- میانگین و انحراف معیار SI در بین گروه‌های مختلف موش

صحرائی (هر گروه ۷ عدد) برحسب درصد

انحراف معیار $\pm$ میانگین	گروه
۹۴/۵ $\pm$ ۰۰/۲۷	نرمال
۵۸/۱۲ $\pm$ ۰۰/۳۶	دیابتی شده
۹۰/۰ $\pm$ ۰۰۵/۷۷	۶۰
۹۱/۰ $\pm$ ۰۰۵/۶۸	۱۲۰
۹۵/۳ $\pm$ ۰۰/۶۹	۲۴۰

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار TDI برحسب درصد در

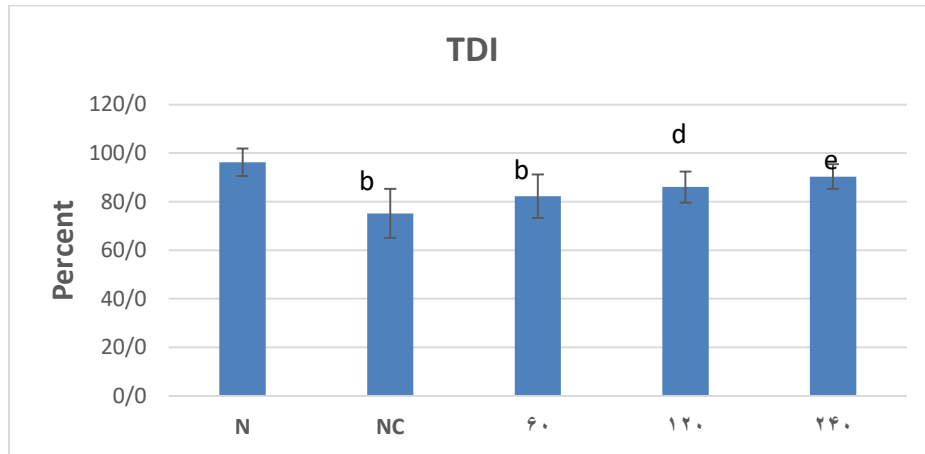
گروه‌های مختلف موش صحرائی (هر گروه ۷ عدد)

انحراف معیار $\pm$ میانگین	گروه
۹۶/۵ $\pm$ ۱۶۷/۶۷	نرمال
۷۵/۱۰ $\pm$ ۱۶۷/۱۲	دیابتی شده
۲۵۰/۰ $\pm$ ۸۲۸/۹۵	۶۰
۶ $\pm$ ۸۶/۴۰	۱۲۰
۹۰/۵ $\pm$ ۳۳۳/۰۷	۲۴۰

آنهایی که فاقد اسپرم هستند، در گروه دیابتی کاهش قابل توجهی داشتند. متعاقب درمان با عصاره ی آبی زعفران این نسبت افزایش پیدا میکند. هیچ اختلاف معنی داری بین گروه دیابتی شده و گروه‌های درمان مشاهده نشد (جدول و نمودار ۳).

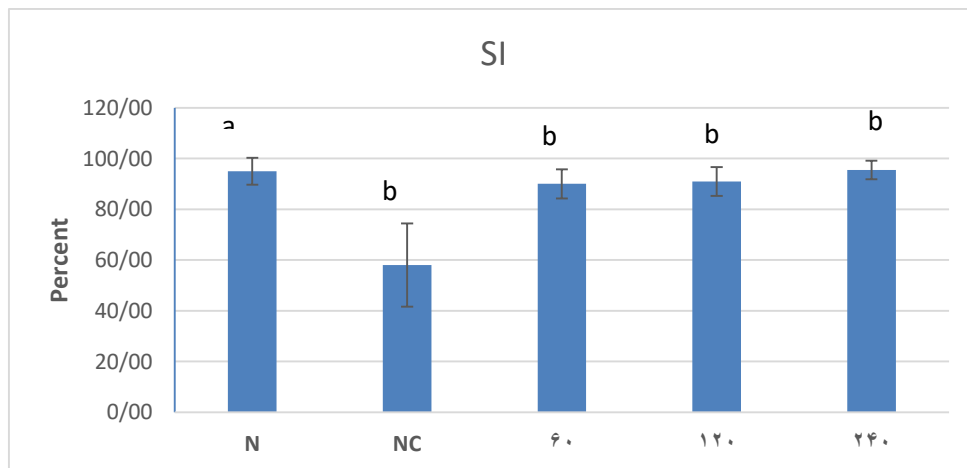
### شاخص اسپرمیوژنز (SI(Spermiogenesis index):

ارزیابی صورت گرفته نشان داد دیابت، شاخص اسپرمیوژنز را نیز تحت تاثیر قرار داده و درصد لوله‌هایی که دارای اسپرم هستند به



نمودار ۲- نمودار مقایسه ی TDI در بین گروه‌های مختلف موش صحرایی (هر گروه ۷ عدد) برحسب درصد

N- گروه نرمال ، Nc-گروه دیابتی، 60- گروه درمان (دوز ۶۰ میلی گرم)، 120- گروه درمان (دوز ۱۲۰ میلی گرم)، 140- گروه درمان (دوز ۱۴۰ میلی گرم). \*ستون‌هایی که حروف آنها ناهمسان است اختلاف آنها معنی دار می باشد ( $P \leq 0.05$ )



نمودار ۳- نمودار مقایسه ی SI بین گروه‌های مختلف موش صحرایی (هر گروه ۷ عدد) بر حسب درصد

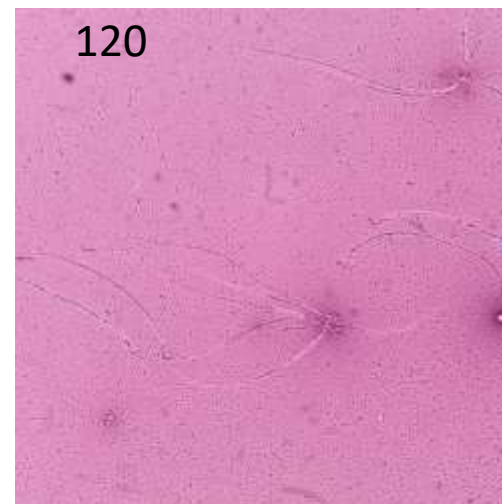
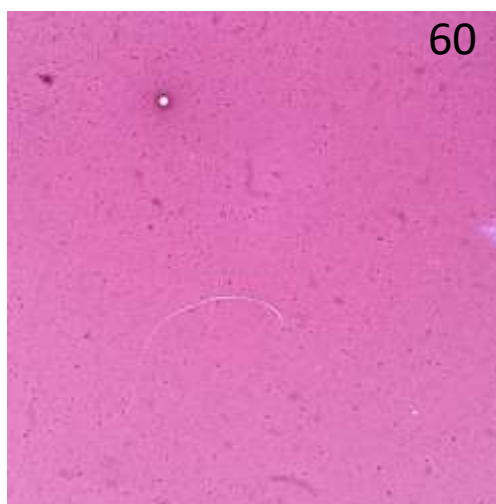
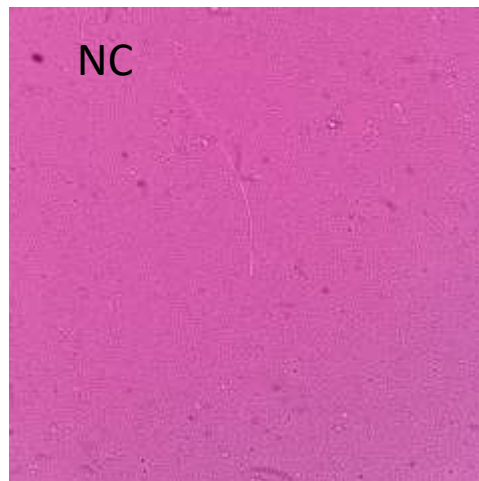
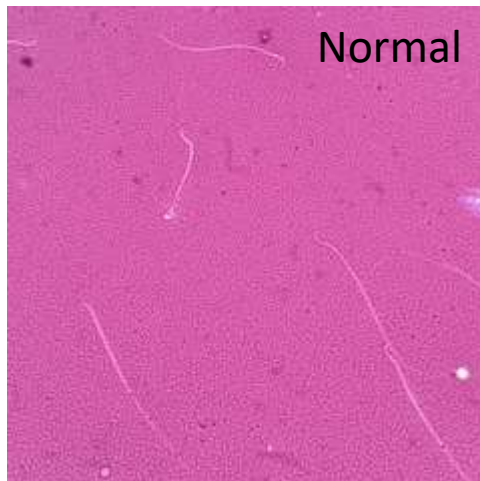
N- گروه نرمال ، Nc-گروه دیابتی، 60- گروه درمان (دوز ۶۰ میلی گرم)، 120- گروه درمان (دوز ۱۲۰ میلی گرم)، 140- گروه درمان (دوز ۱۴۰ میلی گرم). \*اختلاف معنی دار بین گروه دیابتی و کنترل مشاهده شد ولی اختلاف معنی داری بین گروه دیابتی با هیچ یک از گروه درمان مشاهده نشد.

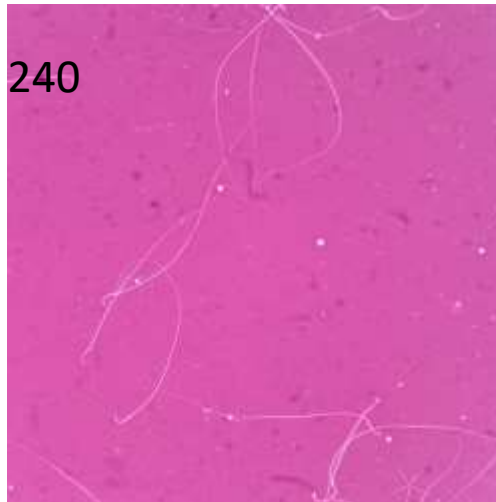
علاوه بر آن برای تعیین زنده ماندن اسپرم‌ها از رنگ آمیزی اختصاصی ائوزین-نکروزین استفاده شد که مطالعه پیش رو نشان داد دیابت سبب کاهش قدرت زنده ماندن اسپرم‌ها می‌شود و متعاقب استفاده از عصاره آبی زعفران در قدرت زنده ماندن اسپرم‌ها افزایش یافت. (تصویر ۶ و جدول ۴)

**تحرك و زنده ماندن اسپرم:** مطالعه ما نشان داد دیابت سبب کاهش تحرك و حرکات پیشرونده اسپرم می‌شود و متعاقب درمان توسط عصاره آبی زعفران، افزایش تحرك و حرکات پیشرونده اسپرم‌ها را شاهد بودیم. بطوری که درمان با عصاره آبی زعفران با دز بالا، سبب افزایش قابل توجهی در حرکت و پیشروندگی اسپرم‌ها می‌شود (جدول ۴).

جدول ۴- میانگین میزان تحرك اسپرم در گروه‌های مختلف موش صحرایی (هر گروه ۷ عدد) بر حسب درصد

نوع حرکت اسپرم	نرمال	دیابتی شده	۶۰	۱۲۰	۲۴۰
پیش رونده	۳۷/۴۲	۰۰/۰	۱۵/۶۸	۳۹/۳۹	۳۶/۶۱
غیر پیش رونده	۲۳/۵۵	۰/۳۷	۱۸/۹۴	۲۶/۰۸	۲۲/۹۷
نامتحرك	۳۹/۰۲	۹۹/۶۳	۶۵/۳۷	۳۴/۵۲	۴۰/۴۱
متحرك	۶۰/۹۷	۰/۳۷	۳۴/۶۲	۶۵/۴۷	۵۹/۵۹





تصویر ۶: تعیین زنده مانی اسپرم در گروه‌های مختلف موش صحرایی (هر گروه ۷ عدد) با رنگ آمیزی اتوزین-نگروزین

## بحث

از زعفران به عنوان یکی از گیاهان دارویی در طب سنتی یاد میشود که از مهمترین ترکیبات موجود در آن میتوان به کروسین، پیکروکروسین و سافرانال اشاره کرد. همچنین مطالعات فراوانی بر روی خاصیت هیپوگلیسمیک، هیپولیپیدمیک و آنتی‌اکسیدانی زعفران طی سالیان متمادی انجام شده است که نشان می‌دهد عصاره زعفران و ترکیبات آن علاوه بر اثرات فوق، دارای اثرات ضدافسردگی، ضد تشنجی، ضد التهابی، ضد توموری و از بین برنده رادیکالهای آزاد می‌باشد (۱۶). روش‌هایی که در حال حاضر برای درمان دیابت غیر وابسته به انسولین استفاده می‌شوند مانند تغییرات رژیم غذایی و عوامل هیپوگلیسمیک خوراکی، محدودیت‌های خاص خود را دارند. بیماری دیابت سبب آسیب به بافت‌های مختلف بدن از جمله کلیه و بیضه می‌گردد که در بعضی مواقع به ناتوانی جنسی منجر می‌شود. گیاهان دارویی برای درمان دیابت بطور وسیعی بویژه در کشورهای آسیای میانه رایج هستند و سازمان بهداشت جهانی نیز در مورد استفاده از این گیاهان در این کشورها توصیه‌هایی را ارائه نموده است (۱). به با توجه به اهمیت بالای زعفران در ایران، سوابق پژوهشی زیادی در سایر کشورها موجود نمی‌باشد. لذا با توجه به اثرات نامطلوب دیابت بر سیستم تولید مثل در مردان و بافت بیضه، در این

مطالعه اثرات عصاره آبی زعفران بعنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی بر روی شاخص‌های هیستومورفومتریک و اسپرماتوژنز و سطح سرمی تستوسترون و تحرک و قدرت زنده مانی اسپرم مورد بررسی قرار گرفت. غشای اسپرم بدلیل برخورداری از اسیدچرب غیر اشباع، نسبت به استرس اکسیداتیو بسیار حساس می‌باشد و همانطور که مطالعات گذشته نشان داد عصاره آبی زعفران بدلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی، می‌تواند از بروز استرس اکسیداتیو در بیضه جلوگیری کند (۱۱ و ۲). سفیدگر و همکارانش در سال ۲۰۱۹ نشان دادند که تحرک و زنده مانی اسپرم در گروه دیابتی درمان شده با کروسین که ماده مؤثره آبی زعفران است، افزایش یافت (۱۸). نتایج مطالعه‌ی ما نیز ثابت می‌کند که دیابت بر روی تحرک و زنده مانی اسپرم اثرات منفی دارد که این اثرات سو، عمدتاً بدلیل اکسیداسیون گلوکز مازاد و در نتیجه آن تولید رادیکال‌های آزاد است. در مطالعه پیش رو نیز، عصاره آبی زعفران بعنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان بر روی حرکات اسپرم مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن نشان داد عصاره آبی زعفران با دز متوسط یا ۱۲۰ سبب افزایش بیشتر حرکات پیشرونده آبی اسپرم و بهبود بیشتر اثرات سو دیابت بر روی اسپرم می‌شود. همانطور که مطالعات هالند و همکارانش نشان داد دیابت سبب کاهش سطح سرمی تستوسترون و ایجاد قطرات چربی در سلولهای لیدیک بیضه که در حالت طبیعی قابل مشاهده نیست، می‌

حداقل یک الکترون جفت نشده در ساختار خود، بسیار واکنش‌پذیر بوده، بطوری که قادرند با انواع ماکرومولکول‌های زیستی واکنش داده و نهایتاً منجر به اکسیداسیون آن‌ها گردد. تولید کنترل‌شده و متعادل ROS توسط اسپرماتوزوآ و دیگر سلول‌ها برای متابولیسم هوایی ضروری است، به طوری که در غلظت‌های پایین، نقش‌های فیزیولوژیکی زیادی برای سلول‌ها دارند و به عنوان واسطه‌گرهای مهمی در مکانیسم‌های پیام‌رسانی داخل سلولی عمل می‌کنند. اما تولید بیش از حد ROS ها اثرات زیان‌باری بر عملکرد سلول دارد (۱۹ و ۵). تحقیقات زیادی نشان داده اند که ROS ها با پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع در ناحیه سر و قطعه میانی اسپرم و به موجب آن تغییر مورفولوژی اسپرم، کاهش تحرک اسپرم در نقص عملکرد اسپرم نقش اساسی داشته باشد (۴).

علی‌رغم القای دیابت توسط داروی استرپتوزوتوسین و بروز علائم بالینی در حیوانات آزمایشگاهی و بروز تلفات شدید در بین گروه‌های دیابتی، انجام دقیق آزمایشات سرمی و ارتباط آن با شاخص‌های اسپرماتوزن و تحرک و زنده‌مانی اسپرم از جمله نقاط برجسته مطالعه پیش روی می‌باشد. همچنین در مطالعات بعدی میتوان نحوه‌ی بیماری‌زایی دیابت در بافت بیضه را از جنبه مولکولی مثل میزان بیان آنتی ژن های P53, Bcl2 و Caspase3 بررسی کرد.

#### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه و آنالیز داده‌های آزمایشات موجود در آن، بر ایجاد آسیب روی بافت بیضه در اثر دیابت و اختلال در باروری مردان تاکید دارد و استفاده از عصاره آبی زعفران با خاصیت آنتی‌اکسیدانی میتواند در بهبود آسیب‌های حاصله بویژه حرکات طبیعی اسپرم که نقش اساسی در باروری و لقاح دارد، یاری‌دهنده باشد.

تضاد منافع: نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

شود (۸). مطالعه ما نیز این مطلب را اثبات کرد و نشان داد عصاره آبی زعفران بعنوان یک ترکیب هیپوگلیسمیک با دز متوسط یا ۱۲۰ سبب افزایش سطح سرمی تستوسترون و بهبود شکل ساختاری و عملکردی سلولهای لیدیک می‌شود. همانگونه که ذکر شد یکی از ترکیبات فعال موجود در عصاره آبی زعفران، کروسین است که این ماده با مکانیسم‌های مختلفی سبب افزایش سطح سرمی تستوسترون می‌شود. مدرسی و همکارانش نشان دادند کروسین حساسیت محور هیپوفیزیال-هیپوتالاموسی را برای کنترل بازخورد تستوسترون بر ترشح گنادوتروپین کاهش می‌دهد. همچنین، اثرات آنتی‌اکسیدانی کروسین ممکن است غلظت هورمون تستوسترون را در موش‌های آزمایشگاهی نر تغییر دهد (۱۲).

مطالعات پیشین نشان داد باروری و اسپرماتوزن تحت تاثیر دیابت، بدنبال کاهش قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و قطر لومن و ضخامت اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز و افزایش ضخامت غشای پایه لوله‌های اسپرم‌ساز، کاهش می‌یابد (۶ و ۱۰). که مطالعه ما هم این مطلب را تایید میکند و عصاره آبی زعفران سبب افزایش قطر لوله اسپرم‌ساز و ضخامت اپی‌تلیوم آنها شد. دیابت همچنین سبب کاهش قطر لومن شد که گروه‌های درمان با عصاره آبی زعفران خصوصاً گروه‌های تحت درمان با ۶۰ و ۱۲۰ نتوانستند این کاهش را جبران کنند که علت آن را میتوان به شدت آسیب در موضع مورد نظر ربط داد. علاوه بر آن دیابت سبب کاهش شاخص تمایز لوله‌ای و شاخص اسپرمیوزن می‌شود که متعاقب درمان با عصاره آبی زعفران با افزایش دز تدریجی، این شاخص‌ها نیز بصورت تدریجی افزایش می‌یابند. نهایتاً با توجه به نقش استرس اکسیداتیو در بروز عوارض ناشی از دیابت در بافت بیضه، استفاده از یک ترکیب دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی مثل عصاره آبی زعفران میتواند سبب بهبود و کاهش اثرات استرس اکسیداتیو و ROS ها در بافت بیضه شود. ROS ها (Reactive Oxygen Species) به خانواده رادیکال‌های آزاد تعلق دارند که به خاطر داشتن

## تشکر و قدر دانی

مشهد که در انجام این پروژه مساعدت لازم را فراهم آوردند، مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام میدارند.

بدینوسیله نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی

## منابع

- ۱- حیدری، س، شیرودی، ع، حجتی، و، ۱۳۹۶، اثر عصاره آبی هسته انگور (*Vitis vinifera*) بر آسیب بیضه ای در موش های صحرائی
۱۱. Mahmoud AM, Hussein O E. Protective Effects of Umbelliferon in Experimental Testicular Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Ana Physio: cur res*.2015; 6:1. <https://www.longdom.org/open-access/protective-effects-of-umbelliferone-in-experimental-testicular-ischaemia-reperfusion-injury-in-rats-22854.html>.
۱۲. Modaresi, M., Messripour, M., Asadi Marghmaleki, M., & Hamadianian, M. (2008). Effect of Saffron (*Crocus Sativus*) extract on level of FSH, LH and testosterone in mice. *Journal of Advances in Medical and Biomedical Research*, 16(63), 11-18.
۱۳. Mutalik, S., B. Sulochana, M. Chetana, N. Udupa and V.P. Devi, 2003. Preliminary studies on acute and subacute toxicity of an antidiabetic herbal preparation. *Indian J. Experimental Biol.*, 41: 316-320.
۱۴. Nirmala, A., S. Saroja, H.R. Vasanthi and G. Lalitha, 2009. Hypoglycemic effect of *Basella rubra* in streptozotocin induced diabetic albino rats. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 1: 025-030.
۱۵. Ríos JL, Recio MC, Giner RM, Mán ez S. 1996. An update review of saffron and its active constituents. *Phytother Res* 10:189-193.
۱۶. Ríos JL, Recio MC, Giner RM, Mán ez S. 1996. An update review of saffron and its active constituents. *Phytother Res* 10: 189-193.
۱۷. Sadik NAH, El-Seweidy MM, Shaker OG. (2011). The antiapoptotic effects of sulphurous mineral water and sodium hydrosulphide on diabetic rats testes. *Cell Physiol Biochem* ; 28: 887-898.
۱۸. Sefidgar, S. M., Ahmadi-Hamedani, M., Javan, A. J., Sani, R. N., & Vayghan, A. J. (2019). Effect of crocin on biochemical parameters, oxidative/antioxidative profiles, sperm characteristics and testicular histopathology in streptozotocin-induced diabetic rats. *Avicenna journal of phytomedicine*, 9(4), 347.
۱۹. Sharma, R.K. & Agarwal, A. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, 48(6): 835-850.
- نر دیابتی شده با استرپتوزوتوسین، مجله پژوهش های جانوری (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۳۰، شماره ۳، صفحات ۲۷۸-۲۷۱.
2. Agrawal, A.; Hamada, A. & Esteves, S.C. (2012). Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. *Nature Reviews Urology*, 9(12): 678-690.
3. Agarwal, A. & Prabakaran, S.A. (2005). Mechanism, measurement and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Experimental Biology*, 43(11): 963-974.
4. Alotaibi M F, Al-Joufi F, Abou Seif H S, et al. Umbelliferone Inhibits Spermatogenic Defects and Testicular Injury in Lead-Intoxicated Rats by Suppressing Oxidative Stress and inflammation, and Improving Nrf2/HO-1 Signaling. *Drug Des Dev and Ther*.2020;14: 4003-4019.
5. Asadi, M. H., Zafari, F., Sarveazad, A., Abbasi, M., Safa, M., Koruji, M., Miran, R. A.(2014). Saffron improves epididymal sperm parameters in rats exposed to cadmium. *Nephro-urology monthly* 6(1).
6. Atalay Uslu B, Ilhan F, Gulyuz F, Karasu A, Tas A, Seadag S, et al.2012. The effects of sildenafil citrate and vitamins A, C and E on testicular damage in alloxan-diabetic rats. *J Anim Vet Adv*.11:56-63.
7. Grover, J.K., S. Yadav and V. Vats, 2002. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *J . Ethnopharmacol.*, 81: 81-100.
8. Howland BE, Zebrowsky EJ (1976) Some effects of experimentally-induced diabetes on pituitary-testicular relationships in rats. *Horm Metab Res* 8:465-469.
9. Kanter M, Aktas C, Erboga M.( 2012). Protective effect of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Food Chem Toxicol* 4 5 T ; 50: 719-725.
10. Kianifard D, Sadrkhanlou RA, Hasanzadeh S. The histological, histomorphometrical and histochemical changes of testicular tissue in the metformin treated and untreated streptozotocin-induced adult diabetic rats. *Vet Res Forum*. 2011;2:13-24.

# Evaluation of Testosterone hormone and Spermatogenic Indices in Diabetic Rats Treated with Aqueous Saffron Extract (*Crocus Sativus L.*)

Poursadeghi F.<sup>1</sup>, Ahmad Ali Mohammadpour<sup>1</sup>, and Moosavi Z.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran.

<sup>2</sup> Dept. of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran

## Abstract

Previous studies show that herbal compounds can be effective in the treatment of many diseases, including diabetes. Diabetes is a serious metabolic disease that can disrupt the normal function of the reproductive system. For this purpose, the effect of aqueous saffron extract on the level of testosterone hormone and spermatogenesis indices in diabetic Wistar rats was investigated. In this study, 35 male Wistar rats were divided into 5 groups. In order to induce diabetes, the drug streptozotocin was used in the amount of 90 mg/kg. In order to evaluate the effect of saffron extract, the treatment of animals continued for 35 days. After the end of the treatment period, the animals were euthanized by deep anesthesia. Blood samples were collected to measure the testosterone serum level. Then, sampling of the testicular tissue was done, and the routine steps of tissue section preparation were performed. Finally, the samples were prepared for the histomorphometry evaluations of the testis. In addition to these, Tubular Differentiation Index (TDI) and Spermiogenesis Index (SI) were calculated. Also, sperm motility and viability were analyzed. In the diabetic group, the thickness of the epithelium and the diameter of the spermatogenic tubes decreased, and the saffron extract with doses of 120 and 240 mg improved the damage. Also, diabetes causes a decrease in serum testosterone, and saffron extract, especially at a dose of 120, causes a significant increase in this hormone. Observations showed that saffron extract can reduce the negative effects of diabetes on testicular tissue and its histomorphometric characteristics due to its antioxidant properties.

**Key words:** Histomorphology, Aqueous saffron extract, Diabetes, Testis, Spermatogenic indices, Rat