

بررسی اثر کروسین بر میزان Bax، Bcl2 و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت بیضه موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

غزال عطائی^۱، راهله رهباریان^۱، مجید رجیبیان نقندری^۱

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

چکیده

تاریخ دریافت: ۲۷ دی ۱۳۹۷

تاریخ پذیرش: ۲۸ فروردین ۱۳۹۸

تاریخ انتشار: ۰۹ مهر ۱۳۹۸

اهداف: دیابت نوع اول از شایع‌ترین بیماری‌های غدد درون‌ریز است و باعث استرس‌های اکسیداتیو در بافت بیضه می‌شود. امروزه در درمان دیابت گرایش به سوی داروهای گیاهی روزبه‌روز گسترش می‌یابد. این مطالعه با هدف بررسی اثرات کروسین بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانت و میزان Bax و Bcl2 در موش‌های صحرایی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی که در دانشگاه پیام نور انجام شد، ۲۴ سر موش صحرایی به چهار گروه کنترل، کنترل دیابتی، دیابتی تحت تیمار با کروسین (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۲۵ روز تزریق داخل صفاقی) تقسیم شدند. گروه‌های دیابتی با یک بار تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین دیابتی شدند. در روز ۲۵ آزمایش، بیضه موش‌ها به منظور ارزیابی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و شاخص‌های Bax و Bcl2 خارج شد. نتایج توسط نسخه ۲۰ نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی LSD تحلیل شدند.

یافته‌ها: سطح بافتی شاخص Bax و مقدار مالون‌دی‌آلدئید در گروه تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین در مقایسه با گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین و گروه کنترل دیابتی کاهش معنی‌داری داشت؛ همچنین در مقدار سطح بافتی شاخص Bcl2 و آنزیم‌های گلوکاتایون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در گروه تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین نسبت به گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین و گروه کنترل دیابتی افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0.05$) که نشان‌دهنده اثر وابسته به غلظت کروسین است. همچنین کروسین سبب کاهش معنی‌داری در میزان قند خون موش‌های دیابتی شد.

نتیجه‌گیری: کروسین موجب بهبود شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و همچنین آسیب‌های ایجاد شده توسط دیابت در بافت بیضه موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود.

کلیدواژه‌ها:

کروسین، Bax، Bcl2، بیضه، موش صحرایی، دیابت

مقدمه

آسیب‌های اکسیداتیو کاهش می‌یابد. تضعیف دفاع آنتی‌اکسیدانی به افزایش تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن^۱ در مایع منی منجر می‌شود و در نهایت موجب آسیب رسیدن به سلول‌های زایا می‌شود [۴، ۳].

مایع منی در افراد سالم حاوی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی مانند آسکوربات، آلفاتوکوفرول و پیرووات است که نقش حفاظت از اسپرماتوزوئید را بر برابر استرس‌های اکسیداتیو را به عهده دارند [۴]. در شرایط طبیعی رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده در مایع منی توسط آنتی‌اکسیدان‌های موجود در مایع منی غیر فعال می‌شود؛ در نتیجه یکی از دلایل ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو و نقص

دیابت از مهم‌ترین بیماری‌های غدد درون‌ریز در جوامع انسانی است که در درازمدت با عوارض جانبی خاص مانند: نفروپاتی، رتینوپاتی، نوروپاتی، کاهش باروری، کاهش قطر تخمدان، اختلالات نعوظ، کاهش تحرک اسپرم و تغییرات بافتی بیضه همراه است [۱]. جمعیت افراد مبتلا به دیابت رو به افزایش است و کشورهای توسعه‌یافته مانند ایالات متحده و کشورهای در حال توسعه را تهدید می‌کند و باعث بیماری‌های قلبی-عروقی، کوری، نارسایی کلیوی و غیره می‌شود [۲]. دیابت در بروز ناباروری و اختلالات هورمونی در مردان نقش مهمی دارد و مشخص شده است در نتیجه دیابت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در بافت بیضه تضعیف شده و توانایی آن در محافظت بافت بیضه در برابر

1. Reactive Oxygen Species (ROS)

* نویسنده مسئول:

دکتر راهله رهباریان

نشانی: تهران، دانشگاه پیام نور، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی.

تلفن: ۳۵۱۸۱۵۷ (۹۱۵) ۹۸+

پست الکترونیکی: ra_rahbarian@yahoo.com

جدید و مؤثر در اولویت قرار گرفته است. بسیاری از گیاهان منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند و می‌توانند اثرات ناشی از اکسیدان‌ها و عوارض برخی از بیماری‌ها مانند دیابت را کاهش دهند. تحقیقاتی که توسط آریکاو و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام شد، نشان می‌دهد در موش‌های دیابتی مقدار تستوسترون و LH در گروه‌های دیابتی شده با آلوکسان در مقایسه با گروه شاهد سالم، کاهش معنی‌داری دارد که این نشان‌دهنده تأثیر دیابت بر کاهش مقدار هورمون‌های مردانه است [۱۲]. همچنین تحقیقات دیگر نشان می‌دهد سطح بالای قند خون ممکن است بر کیفیت اسپرم تأثیر بگذارد و بنابراین پتانسیل باروری در مردان را کاهش دهد [۱۳].

ریس و همکاران در سال ۲۰۰۹ دریافتند دیابت وابسته به انسولین با کاهش میزان اسپرم همراه است و باعث کاهش قدرت و تحرک اسپرماتوزا می‌شود [۱۴]. تحقیقات دیگری نیز در این زمینه انجام شده، ولی طبق مطالعات صورت گرفته در هیچ‌یک به بررسی میزان سطح بافتی شاخص Bax و Bcl2 در بافت بیضه موش‌های دیابتی پرداخت نشده است [۱۷-۱۵، ۱۱].

خواص هیپوگلیسمی^۶ بسیاری از گیاهان دارویی در مدل‌های حیوانی و مطالعات بالینی بررسی و تأیید شده است [۱۸]. یکی از گیاهان دارویی بسیار مهم، کروکوس ساتیووس^۷ از تیره زنبقیان^۸ است که به نام‌های زعفران یا زربران شناخته می‌شود [۱۹]. زعفران، گیاهی چندساله در ایران، هند و یونان است که خواص زیادی از قبیل خواص دارویی، رنگی و غذایی دارد. زعفران یک افزایش‌دهنده غذاست که به عنوان دارو در طب سنتی استفاده می‌شود و خاصیت ضدانعقادی، ضداسفردگی، ضدالتهابی، ضدتومور، بهبود حافظه و یادگیری، ضد فشار خون و غیره دارد [۲۰].

اخیراً گزارش شده که کروسین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی است. سافرانال و کروسین دو ترکیب مهم و اصلی زعفران‌اند و خواص اصلی زعفران به دلیل وجود این دو ماده است. کروسین حساسیت به انسولین را افزایش می‌دهد و ناهنجاری‌های مرتبط با آن را بهبود می‌بخشد [۶]. یکی از این ناهنجاری‌ها زخم‌های گوارشی است که کیان‌بخت و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند عصاره زعفران در بهبود زخم‌های گوارشی و جلوگیری از آسیب‌های مخاطی ناشی از دیابت بسیار مؤثر است [۲۱].

هایپرگلیسمی در دیابت نوع ۱ و ۲ اتفاق می‌افتد و موجب استرس‌های اکسیداتیو می‌شود. سمرقندیان و همکاران نشان دادند عصاره زعفران اثرات متابولیکی ناگوار ناشی از هایپرگلیسمی و دیابت را از بین می‌برد [۸]. هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر گیاهان دارویی بر سلامت انسان‌ها و درمان بیماری‌هاست و

عملکرد اسپرماتوزوا به دلیل عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و غیرفعال شدن آن توسط آنتی‌اکسیدان‌هاست [۴]. این احتمال نیز وجود دارد که افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن سرانجام باعث کاهش فسفوریلاسیون پروتئین‌های آکسونمی و عدم تحرک اسپرم شود که این موجب کاهش سیالیت غشا و در نهایت اختلال در لقاح اسپرم و اووسیت می‌شود [۳].

فشرده‌بودن DNA و حضور آنتی‌اکسیدان‌ها در مایع منی، DNA اسپرم را از آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند. در افراد مبتلا به دیابت با توجه به اینکه DNA اسپرم در معرض غلظت بالای رادیکال‌های آزاد اکسیژن قرار دارد، موجب قطعه‌قطعه شدن آن می‌شود و همچنین پایین‌بودن سطح آنتی‌اکسیدان‌ها در مایع منی و تولید بیش از اندازه رادیکال‌های آزاد اکسیژن، باعث ایجاد ساختار غیرطبیعی در اسپرم افراد مبتلا به دیابت می‌شود [۵].

دیابت ناشی از استرپتوزوتوسین^۲ در موش‌های صحرایی، دیابت نوع ۱ است. عصاره زعفران سطح انسولین سرم را در موش‌های دیابتی و غیردیابتی افزایش می‌دهد و موجب بازسازی سلول‌های β در موش‌های دیابتی با استرپتوزوتوسین می‌شود [۶]. افزایش طولانی‌مدت گلوکز، دلیل اصلی آغاز زنجیره‌ای از واکنش‌های شیمیایی و تشکیل محصولات پیشرفته Glycation^۳ است [۷]. استرس‌های اکسیداتیو به معنای افزایش تولید رادیکال‌های آزاد یا کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و یا هر دو است. در بیماری دیابت، افزایش آپوپتوز در بافت بیضه رخ می‌دهد که از نشانه‌های بارز آن افزایش سطح بافتی شاخص Bax^۴ و کاهش سطح بافتی شاخص Bcl2^۵ در بافت بیضه است که در جهت تشدید آپوپتوز عمل می‌کند. خانواده پروتئین Bcl2 که با ژن Bcl2 کدگذاری می‌شود به‌خوبی شناخته شده است و در علائم بقا یا مرگ‌ومیر در اثرات سلولی دیابت نقش دارد و یک پروتئین آنتی‌آپوپتوتیک است و می‌تواند از آسیب‌های سیتوتوکسیتی جلوگیری کند [۹، ۸].

پروتئین Bax یا پروتئین X وابسته به Bcl2 پروتئین تنظیم‌کننده آپوپتوز است که با ژن Bax رمزگذاری می‌شود و در زمان آسیب به ارگان‌ها از بین می‌رود؛ همچنین باعث القای سیگنال‌های مختلف سلولی می‌شود، پس غلظت این پروتئین‌ها مهم‌ترین عامل در سرنوشت سلولی است [۹، ۱۰]. Bax برای آپوپتوز در سلول‌های طبیعی ضروری است؛ بنابراین بیان بیش از حد Bcl-2 موجب افزایش بقای سلولی می‌شود که با سرکوب آپوپتوز در سلول‌هایی که تحت محرک القای آپوپتوز قرار دارند همراه است [۱۱].

امروزه مطالعه روی گیاهان دارویی با هدف رسیدن به ترکیبات

2. Streptozotocin (STZ)
3. Advanced Glycation End Products (AGES)
4. Bcl2 Associated X (BAX)
5. B-cell lymphoma 2 (BCL2)

6. Hypoglycemia
7. Crocus sativus
8. Iridaceae

ایجاد دیابت تجربی

مدل تجربی دیابت در موش‌های صحرایی به دنبال ۱۶ ساعت ناشتایی با یک بار تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین (Sigma-Aldrich, Germany) به میزان ۵۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ایجاد شد. همچنین از بافر سترات (pH=۵/۴) به عنوان حلال استرپتوزوتوسین استفاده شد. تزریق استرپتوزوتوسین به گروه کنترل دیابتی و دو گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین صورت گرفت. با توجه به اینکه مطالعه، روی دیابت مزمن است، حدود سه روز پس از تزریق استرپتوزوتوسین جهت تأیید القای دیابت تجربی از ورید دمی خونگیری صورت گرفت و قند خون توسط دستگاه گلوکومتر مدل IGM-0002A (EasyGluco, Ko-rea) اندازه‌گیری شد. همچنین قند خون بالای ۳۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به عنوان شاخص دیابتی شدن و روز صفر آزمایش در نظر گرفته شد [۲۲]. میزان قند خون موش‌ها قبل از دیابتی شدن و سپس در روزهای ۸، ۱۶ و ۲۴ پس از شروع تیماردهی نیز مجدداً اندازه‌گیری شد. میانگین وزن موش‌های صحرایی نیز در هر گروه در روزهای ۱، ۸، ۱۶ و ۲۴ بعد از شروع تیماردهی سنجش شد.

اندازه‌گیری پارامترهای خونی

در پایان دوره تیمار، موش‌های صحرایی با دیابتی اتر (Merck, Germany) بیهوش شدند سپس، بافت بیضه از بدن حیوان آزمایشگاهی خارج شد و پس از شست‌وشو با محلول سالین جهت سنجش پارامترهای مدنظر به آزمایشگاه منتقل شد. سطح بافتی پارامترهای موردبررسی توسط روش ELISA، دستگاه الیزاریدر مدل ۲۱۰۰ (Stat Fax, USA) و کیت‌های شرکت فاین تست (Finetest, China) سنجش شد.

سنجش‌ها بر اساس بازه و حساسیت هر پارامتر به این قرار است: شاخص سطح بافتی Bax با بازه ۲۰-۳۱۲/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و حساسیت $0/1188$؛ شاخص سطح بافتی Bcl2 با بازه ۱۰-۱۵۶/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و حساسیت $0/094$؛ آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز با بازه ۵۰-۷۸۱/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و حساسیت $0/469$؛ آنزیم گلوکاتیون پراکسیداز با بازه ۲۰۰-۳۱۲/۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و حساسیت $0/1875$؛ آنزیم کاتالاز با بازه ۲۰۰۰-۳۱/۲ واحد بین‌المللی میلی در هر میلی‌لیتر و حساسیت $0/1875$، مقدار مالون دی‌آلدئید با بازه ۵۰۰-۷/۸۱۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر و حساسیت $0/688$ [۲۴، ۲۳].

تجزیه و تحلیل آماری

اطلاعات به‌دست‌آمده با نسخه ۲۰ نرم‌افزار آماری SPSS تحلیل شد. با توجه به اینکه نتایج به‌دست‌آمده کمی است، توسط آزمون

ضرورت انجام این پژوهش از آنجا احساس می‌شود که دیابت یکی از بیماری‌هایی است که انسان‌های زیادی به آن مبتلا هستند و موجب مشکلات بسیاری از جمله مشکلات ناباروری می‌شود؛ از طرفی استفاده از داروهای شیمیایی برای سلامت انسان‌ها مضر است و همچنین امکان استفاده از گیاهانی مانند زعفران که بومی ایران هستند، میسر است؛ بنابراین در این پژوهش به بررسی اثر کروسین بر میزان Bax، Bcl2 و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت بیضه موش‌های صحرایی دیابتی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۷ در دانشگاه پیام نور انجام شد تعداد ۲۴ سر موش صحرایی با محدوده وزنی 195 ± 4 گرم و سن تقریبی 95 ± 3 روز تهیه شد. حیوانات در دمای 24 ± 3 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی 35 ± 4 درصد و دوره روشنایی تاریکی ۱۲ ساعته در قفس‌های استاندارد پلی‌کربنات شفاف (رازی راد، ایران) نگهداری شدند و آب به مقدار کافی توسط بطری پلاستیکی ۵۰۰ میلی‌لیتر در اختیار آن‌ها قرار داده شد. همچنین از غذای فشرده مخصوص موش با فرمول استاندارد (دانه‌داران توس، ایران) تغذیه کردند. به منظور حصول حالت سازش با محیط، آزمایش‌ها پس از گذشت حداقل ۱۰ روز پس از استقرار حیوانات به انجام رسید. در این مطالعه کلیه اعمال جراحی و نمونه‌گیری‌ها تحت بیهوشی کامل انجام شد. همچنین سعی شده است از کمترین تعداد نمونه قابل قبول استفاده شود. رعایت تمامی حقوق حیوانات آزمایشگاهی در پژوهش برای استفاده انسانی مبتنی بر دستورالعمل‌های بین‌المللی مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی بود.

طراحی آزمایش و گروه‌بندی

موش‌های صحرایی به صورت تصادفی به چهار گروه (در هر گروه شش سر موش صحرایی) کنترل، کنترل دیابتی، دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین تقسیم شدند. موش‌های صحرایی گروه کنترل به مدت ۲۵ روز، به صورت داخل صفاقی، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سالین به عنوان حلال دارو دریافت کردند. موش‌های صحرایی گروه کنترل دیابتی پس از القای دیابت تجربی توسط استرپتوزوتوسین با غلظت ۵۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش، به مدت ۲۵ روز به صورت داخل صفاقی، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سالین به عنوان حلال دارو دریافت کردند.

دو گروه دیگر موش‌های صحرایی پس از القای دیابت تجربی به مدت ۲۵ روز، ۰/۵ میلی‌لیتر غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت داخل صفاقی، کروسین دریافت کردند.

میلی لیتر کروسین، تغییر معنی داری نسبت به گروه کنترل دیابتی نشان نداد. میزان مالون دی آلدئید در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل دیابتی نشان داد ($P < 0/05$). سطح بافتی شاخص های Bax و مالون دی آلدئید در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین در مقایسه با گروه شاهد دیابتی به طور معنی داری کاهش یافت ($P < 0/05$).

سطح بافتی شاخص Bcl2 و آنزیم های کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین در مقایسه با گروه شاهد دیابتی به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0/05$). در مقایسه دو غلظت کروسین، نتایج نشان داد سطح بافتی شاخص Bcl2 و آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز، در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین به طور معنی داری بیشتر از گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین است ($P < 0/05$). همچنین سطح بافتی شاخص Bax و مقدار مالون دی آلدئید در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین به طور معنی داری کمتر از گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین است که این امر نشان دهنده اثر وابسته به غلظت کروسین است (جدول شماره ۱ و ۲).

از نظر میزان قند خون نتایج نشان داد قبل از دیابتی شدن موش ها در همه گروه ها اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P > 0/05$). در مقایسه گروه کنترل دیابتی با کنترل سالم، میانگین قند خون در روزهای ۸، ۱۶ و ۲۴ بعد از شروع تیمار دارای افزایش معنی دار بود ($P < 0/05$). همچنین در مقایسه گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین نسبت به شاهد دیابتی،

کلوموگروف اسمیرنوف^۹ فرض طبیعی بودن توزیع فراوانی داده ها بررسی شد. جهت مقایسه میانگین بین گروه های مورد آزمایش از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه^{۱۰} و جهت مقایسه زوج گروه ها از آزمون تعقیبی LSD استفاده شد. همچنین نتایج به دست آمده به همراه محاسبات آماری مربوطه به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد. سطح معنی داری در آزمون ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد ($P < 0/05$).

یافته ها

نتایج حاصل از تحلیل داده های مطالعه حاضر نشان داد سطح بافتی شاخص های Bax و مقدار مالون دی آلدئید در گروه کنترل دیابتی در مقایسه با کنترل سالم به طور معنی داری افزایش یافته است. مقدار Bcl2 و آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز در گروه کنترل دیابتی در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی داری کاهش یافت ($P < 0/05$). سطح بافتی شاخص Bcl2 در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین در مقایسه با گروه کنترل دیابتی تفاوت معنی داری نداشت، ولی آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین به طور معنی داری افزایش یافت ($P < 0/05$).

افزایش میزان آنزیم کاتالاز نیز در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین نسبت به کنترل معنی دار نبود، ولی کاهش شاخص Bax در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین به شاهد دیابتی معنی دار بود ($P < 0/05$). همچنین میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی گرم بر

9. Kolmogorov-Smirnov

10. One-way ANOVA

جدول ۱. میانگین سطح Bax، Bcl2 و آنزیم های آنتی اکسیدانی در بافت بیضه موش های سالم و دیابتی تحت تیمار با کروسین به تفکیک گروه

گروه	سالم	شاهد دیابتی	دیابتی تیمار با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین	دیابتی تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین
Bax	۱/۴۰±۰/۰۸ ^f	۱/۶۰±۰/۲۹ ^a	۱۵/۲۹±۰/۴۳ ^b	۲/۶۴±۰/۲۵ ^e
Bcl2	۸/۰۷±۰/۱۶ ^e	۰/۹۵±۰/۰۵ ^d	۱/۰۵±۰/۰۵ ^d	۶/۵۰±۰/۲۸ ^b
SOD	۴۱/۳۷±۱/۴۳ ^a	۳/۲۲±۰/۰۴ ^c	۵/۲۲±۰/۳۳ ^c	۲۵/۳۹±۲/۹۵ ^b
GPX	۵۶۴/۱۲±۵/۳۳ ^a	۱۰۳/۱۱±۳/۰۹ ^e	۱۲۳/۰۱±۱۱۷/۲۳ ^d	۳۱۸/۷۰±۵/۹۰ ^c
CAT	۳۳۷/۵۱±۴/۰۲ ^a	۱۱۴/۳۶±۳/۷۹ ^e	۱۲۱/۲۸±۲/۴۰ ^c	۳۴۹/۵۵±۷/۰۵ ^b
MDA	۲۴/۶۶±۲/۴۳ ^d	۲۴۵/۹۴±۴/۴۳ ^a	۲۱۰/۲۳±۱۲/۳۱ ^b	۷۳/۱۶±۵/۹۴ ^c

طبق آزمون LSD میانگین های دارای حرف مشترک اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند ($P < 0/05$)

Bax: ng ml-1, Bcl2: ng ml-1, SOD: ng ml-1, GPX: Pg ml-1, CAT: mIU/ml, MDA: ng ml-1

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر کروسین با دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بر Bcl2، Bax و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت بیضه موش‌های سالم و دیابتی

میانگین مربعات پارامترهای اندازه‌گیری شده						درجه آزادی	منابع تغییر
MDA	CAT	GPX	SOD	Bcl2	Bax		
۴۵۴۷۳/۳*	۱۰۶۳۷۱*	۱۸۴۹۲۰*	۱۳۳۶/۸۶*	۵۲/۶۹*	۳۳۳/۳۰*	۵	مدل
۵۳/۱	۲۲	۹۳	۲/۷۲	۰/۰۲	۰/۰۸۷	۱۸	خطا
						۲۳	کل

* و NS به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح ۰/۰۵، ۰/۰۱ و نبود اختلاف معنی‌دار است.

افق دانش

Bax: ng ml-1، Bcl2: ng ml-1، SOD: ng ml-1، GPX: Pg ml-1، CAT: mIU/ml، MDA: ng ml-1

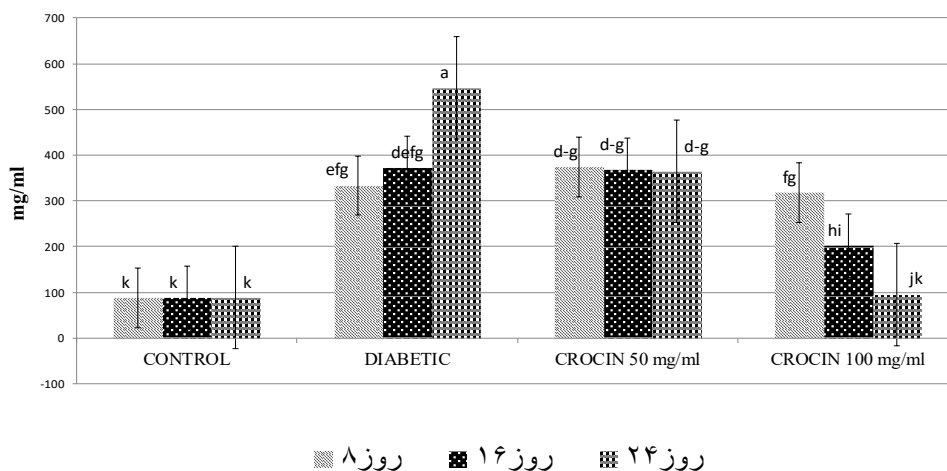
تیمار با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین نسبت به شاهد دیابتی، در روزهای ۸ و ۱۶ اختلاف معنی‌داری در وزن موش‌ها مشاهده نشد، ولی در روز ۲۴، افزایش معنی‌داری در میانگین وزن موش‌های صحرایی تحت تیمار با کروسین ۵۰ مشاهده شد ($P < 0/05$). در روز ۱۶ در مقایسه گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین نسبت به کنترل دیابتی، کاهش میانگین وزن موش‌ها معنی‌دار نبود، ولی در روز ۲۴ افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/05$). در گروه تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین نسبت به گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ کروسین، در روز ۲۴ افزایش میانگین وزن موش‌های صحرایی معنی‌دار بود که نشان‌دهنده اثر وابسته به دوز کروسین است (تصویر شماره ۲).

در روزهای ۸ و ۱۶ اختلاف معنی‌داری بین میزان قندخون گروه‌ها مشاهده نشد، ولی در روز ۲۴ کاهش معنی‌دار بود ($P < 0/05$). نتایج نشان داد از نظر میزان قند خون در مقایسه گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین نسبت به شاهد دیابتی، در روز ۸ اختلاف معنی‌دار نبود. با این حال در گروه دیابتی تحت تزریق کروسین با غلظت ۱۰۰ در روزهای ۱۶ و ۲۴ قند خون پایین‌تری نسبت به گروه کنترل دیابتی نشان دادند ($P < 0/05$). در روز ۱۶ و ۲۴، گروه تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین میزان قند خون پایین‌تری نسبت به گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ کروسین نشان دادند که این امر نشان‌دهنده اثر وابسته به دوز کروسین است (تصویر شماره ۱).

بحث

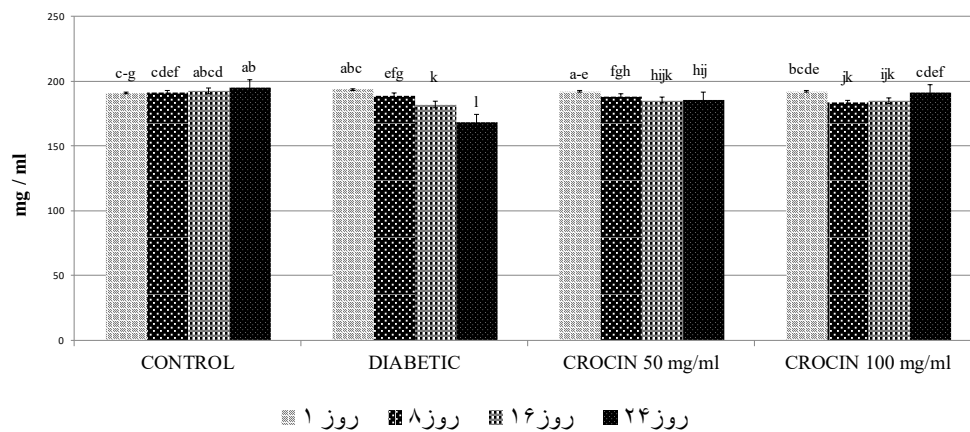
در پژوهش حاضر، اثر کروسین در بهبود پارامترهای اسپرمی در موش‌های صحرایی دیابتی بررسی شد. عوامل دخیل در افزایش استرس‌های اکسایشی در بیماران دیابتی شامل کاهش آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند سوپر اکسید دیسموتاز و گلوکوتاتیون

مطالعات انجام‌شده در رابطه با میانگین وزن موش‌های صحرایی نشان داد در روز یک شروع تیماردهی در همه گروه‌ها اختلاف معنی‌دار نبود ($P > 0/05$). در مقایسه گروه کنترل دیابتی با شاهد سالم در روز ۸ تیماردهی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، ولی در روزهای ۱۶ و ۲۴ کاهش وزن موش‌ها در گروه کنترل دیابتی محسوس بود ($P < 0/05$). در مقایسه گروه دیابتی تحت



تصویر ۱. مقایسه میانگین قند موش‌های دیابتی در روزهای ۸، ۱۶ و ۲۴ بعد از شروع تیماردهی طبق آزمون LSD حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است ($P < 0/05$).

افق دانش



تصویر ۲. مقایسه میانگین وزن موش‌های دیابتی در روزهای ۱، ۸، ۱۶ و ۲۴ بعد از شروع تیماردهی طبق آزمون LSD حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

افق دانش

دیابتی‌شده با آلوکسان مؤثر است که این نتایج، تأییدکننده خواص آنتی‌اکسیدانی زعفران است [۶]. مطالعه بررسی دیابت در کانال‌های Hemomicrocircular بافت بیضه نشان داد دیابت باعث تخریب عمیق در کانال‌های Hemomicrocircular بافت بیضه و کاهش لومن مویرگی می‌شود [۲۶].

سمرقندیان و همکاران مطالعه‌ای را مشابه مطالعه حاضر در مورد اثر عصاره زعفران بر بافت ریه در موش‌های صحرایی دیابتی‌شده انجام دادند که نتایج کار نشان‌دهنده خواص آنتی‌اکسیدانی زعفران و تأثیر مثبت آن بر بهبود سطح آنزیم‌هایی مانند سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز بود [۲۷]. مطالعات صورت گرفته توسط حسنان و همکاران نشان می‌دهد میزان بیان پروتئین Bax در شبکه چشم افراد دیابتی افزایش می‌یابد و موجب آپوپتوز سلول‌ها می‌شود ولی در بیماران تحت درمان، میزان بیان Bax کاهش یافته و در مقابل برای سرکوب آپوپتوز در سلول‌ها، بیان Bcl2 افزایش می‌یابد [۱۱].

ایرج جعفری انارکولی و همکاران در مطالعه‌ای دیگر نشان دادند دیابت باعث افزایش بیان پروتئین Bax و کاهش بیان Bcl2 در سطح mRNA هیپوکامپ موش‌های دیابتی می‌شود. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد استفاده از انسولین و اسیدآسکوربیک به تنهایی و به صورت ترکیبی می‌تواند از طریق افزایش میزان بیان Bcl2 و کاهش میزان بیان ژن Bax، آپوپتوز را در هیپوکامپ موش‌های صحرایی دیابتی مهار کند [۱۷].

یافته‌های حاصل از انجام این مطالعه نیز نشان داد سطح بافتی شاخص Bax و مقدار مالون دی‌آلدئید در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم دارای افزایش معنی‌داری است. با این حال سطح بافتی شاخص Bcl2 و آنزیم‌های گلوکوتاتیون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز کاهش معنی‌داری یافت. در مقایسه گروه‌های تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ و ۵۰ میلی گرم بر

پراکسیداز است. در افراد سالم میزان مالون دی‌آلدئید کمتر از افراد دیابتی است و میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بیشتر از افراد دیابتی است [۲۵].

بر اساس نتایج به دست آمده کروسین با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر توانست میانگین درصد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و گلوکوتاتیون پراکسیداز را نسبت به گروه کنترل دیابتی به طور معنی‌داری افزایش دهد؛ همچنین مقدار مالون دی‌آلدئید را به طور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0.05$). با توجه به اینکه همه موش‌های گروه آزمایش تیمار شده با کروسین و گروه کنترل دیابتی توسط استرپتوزوتوسین دیابتی شده‌اند، می‌توان بهبودی در پارامترهای کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز، گلوکوتاتیون پراکسیداز و سطح بافتی شاخص Bcl2 در گروه آزمایش تیمار شده با کروسین را به ترکیبات مؤثر در این گیاه نسبت داد. پژوهش‌ها نشان داده است کروسین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بسیار است و موجب افزایش سطح انسولین خون و کاهش سطح قند خون نمونه‌های دیابتی می‌شود و همچنین تاکنون هیچ‌گونه اثر مخربی از کروسین بر بافت کبد و کلیه گزارش نشده است [۶].

افزایش سطح سرمی قند خون در دیابت باعث افزایش سطح رادیکال‌های آزاد و در نهایت افزایش استرس‌های اکسیداتیو سلولی می‌شود [۴]. تحقیقات دیگری نیز در زمینه بررسی کروسین و بررسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در موش‌های دیابتی انجام شده است؛ برای مثال شیرعلی و همکاران در سال ۱۳۹۱ به بررسی اثر کروسین در مقاومت انسولین و پروفایل‌های لیپیدی پرداختند و نتایج آن‌ها نشان داد کروسین دارای اثرات ضد دیابتی است و موجب بهبود پروفایل لیپیدی در مبتلایان به دیابت می‌شود [۷]. در مطالعه‌ای که توسط کیان‌بخت و همکاران درباره اثرات ضد هیپرگلیسمی زعفران انجام شد، نشان داده شد کروسین و ساfranال در احیای سلول‌های بتا در موش‌های

حامی مالی

هزینه اجرای این پژوهش به عهده شخص دانشجو بوده است.

مشارکت نویسندگان

هرسه نویسنده در همه موارد با هم مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

میلی لیتر کروسین کاهش معنی داری در سطح بافتی شاخص Bax و میزان مالون دی‌آلدئید در گروه تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین نسبت به گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ کروسین مشاهده شد، ولی سطح بافتی شاخص Bcl2 و آنزیم‌های گلوکوتایون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در گروه تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین، افزایش معنی داری نسبت به گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر کروسین نشان داد که دلیل آن اثر وابسته به غلظت کروسین است ($P < 0.05$).

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت افزایش معنی دار در سطح آنزیم‌های کاتالاز، گلوکوتایون پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز در گروه تیمار شده با غلظت بالای کروسین (۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) در مقایسه با گروه کنترل دیابتی به معنای اثرات مثبت کروسین بر بافت بیضه موش‌های دیابتی است.

نتیجه‌گیری

کروسین با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر توانست شاخص سطح بافتی Bax را کاهش و سطح بافتی Bcl2 و همچنین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و گلوکوتایون پراکسیداز را نسبت به گروه شاهد دیابتی به طور معنی داری افزایش دهد؛ همچنین آسیب‌های القاشده توسط دیابت در بافت بیضه موش‌های صحرایی را بهبود بخشید.

از آنجا که روشن شدن مکانیسم عمل ترکیبات مؤثر گیاه زعفران در بهبود پارامترهای اسپرمی و بافت بیضه در نمونه‌های دیابتی نیاز به تحقیقات بیشتر دارد، پیشنهاد می‌شود بررسی‌های سیتولوژیکی بیشتری در این زمینه انجام شود. همچنین از آنجا که در این پژوهش از کروسین در انجام مطالعات استفاده شد می‌توان در مطالعات دیگر از اجزای دیگر عصاره زعفران استفاده کرد و با توجه به مشاهده اثرات مطلوب کروسین بر شاخص‌های ارزیابی شده و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با افزایش غلظت کروسین می‌توان گفت اثربخشی کروسین وابسته به غلظت است؛ بنابراین استفاده از غلظت‌های بالاتر کروسین جهت افزایش اثربخشی آن پیشنهاد می‌شود. از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به تأثیر عوامل مختلف فیزیولوژیکی و محیطی که بر سیستم‌های زنده حاکم است، اشاره کرد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

رعایت تمامی حقوق حیوانات آزمایشگاهی در پژوهش برای استفاده انسانی مبتنی بر دستورالعمل‌های بین‌المللی مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی بود و کد اخلاقی این طرح پژوهشی IR.NUMS.REC.1395.47 است.

References

- [1] Jahromi HK, Dehghan F, Saremi J, Pourahmadi M. The effect of walnut leaf aqueous extract (*Juglans regia* L.) on the embryonic testicles evolutionary trend in streptozotocin-induced rats with type I diabetes. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*. 2017; 7(5):35-40.
- [2] Shahraki MR, Mirshekari H, Khamar Moghadam S. [Effect of short-time consumption of oral magnesium sulfate on blood glucose and serum lipids in streptozotocin-induced diabetic male rats (Persian)]. *Quarterly of the Horizon of Medical Sciences*. 2013; 19(2):67-70.
- [3] Saleh RA, Hcld AA. Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. *Journal of Andrology*. 2002; 23(6):737-52. [DOI:10.1002/j.1939-4640.2002.tb02324.x] [PMID]
- [4] Rahbarian R, Sepehri Moghadam H, Sadoughi SD. [Effect of aqueous extract of *Launaea acanthodes* on testicular tissue and sperm parameters in alloxan-induced diabetic rats (Persian)]. *Quarterly of the Horizon of Medical Sciences*. 2015; 21(1):21-9. [DOI:10.18869/acadpub.hms.21.1.21]
- [5] Ford W. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*. 2004; 10(5):387-99. [DOI:10.1093/humupd/dmh034] [PMID]
- [6] Kianbakht S, Hajiaghaee R. Anti-hyperglycemic effects of saffron and its active constituents, crocin and safranal, in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants*. 2011; 3(39):82-9.
- [7] Shirali S, Bathaie SZ, Nakhjavani M. Effect of crocin on the insulin resistance and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytotherapy Research*. 2013; 27(7):1042-104. [DOI:10.1002/ptr.4836] [PMID]
- [8] Samarghandian S, Borji A, Delkshos MB, Samini F. Safranal treatment improves hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2013; 16(2):352-62. [DOI:10.18433/J3ZS3Q]
- [9] Kiasalari Z, Roghani M, Baluchnejadmojarad T, Abdolrazaghezhad A. [Involvement of bax and Bcl2 in neuroprotective effect of curcumin in kainic acid-induced model of temporal lobe epilepsy in male rat (Persian)]. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*. 2016; 16(1):32-40.
- [10] Yang H, Jin X, Lam CWK, Yan SK. Oxidative stress and diabetes mellitus. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2011; 49(11):1773-82. [DOI:10.1515/cclm.2011.250] [PMID]
- [11] Hasnan J, Yusoff M, Damitri T, Faridah A, Adenan A, Norbaini T. Relationship between apoptotic markers (Bax and Bcl-2) and biochemical markers in type 2 diabetes mellitus. *Singapore Medical Journal*. 2010; 51(1):50-5. [PMID]
- [12] Arikawe A, Daramola A, Odofoin A, Obika L. Alloxan-induced and insulin-resistant diabetes mellitus affect semen parameters and impair spermatogenesis in male rats. *African Journal of Reproductive Health*. 2006; 10(3):106-13. [DOI:10.2307/30032477] [PMID]
- [13] Agbaje I, Rogers D, McVicar C, McClure N, Atkinson A, Mallidis C, et al. Insulin dependant diabetes mellitus: Implications for male reproductive function. *Human Reproduction*. 2007; 22(7):1871-7. [DOI:10.1093/humrep/dem077] [PMID]
- [14] Ricci G, Catizone A, Esposito R, Pisanti F, Vietri MT, Galdieri M. Diabetic rat testes: Morphological and functional alterations. *Andrologia*. 2009; 41(6):361-8. [DOI:10.1111/j.1439-0272.2009.00937.x] [PMID]
- [15] Podesta F, Romeo G, Liu WH, Krajewski S, Reed JC, Gerhardinger C, et al. Bax is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. *The American Journal of Pathology*. 2000; 156(3):1025-32. [DOI:10.1016/S0002-9440(10)64970-X]
- [16] Gurzov EN, Eizirik DL. Bcl-2 proteins in diabetes: Mitochondrial pathways of β -cell death and dysfunction. *Trends in Cell Biology*. 2011; 21(7):424-31. [DOI:10.1016/j.tcb.2011.03.001] [PMID]
- [17] Jafari Anarkooli I, Sankian M, Ahmadvpour S, Haghir H, Bonakdaran S, Varasteh A. [The study of effects of insulin and ascorbic acid on bcl-2 family expression in hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats (Persian)]. *Journal of Advances in Medical and Biomedical Research*. 2007; 15(60):1-16.
- [18] Hajinejad Boshroue R, Behnam Rassouli M, Tehranipour M, Gheybi F, Hajinejad Sh, Elahi Moghaddam Z. [The effects of hydro- alcoholic extract of *launaea acanthodes* on the blood, urine albumin and bilirubin levels in male hyperglycemic Wistar Rat (Persian)]. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2013; 15(2):190-6.
- [19] Amir Ghasemi T. [Saffron red gold of Iran (Persian)]. Tehran: Ayandegan; 2001.
- [20] Hosseinzadeh H, Modaghegh MH, Saffari Z. *Crocus sativus* L. (saffron) extract and its active constituents (crocin and safranal) on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2009; 6(3):343-50. [DOI:10.1093/ecam/nem125] [PMID] [PMCID]
- [21] Kianbakht S, Mozaffari K. Effects of saffron and its active constituents, crocin and safranal, on prevention of indomethacin induced gastric ulcers in diabetic and nondiabetic rats. *Journal of Medicinal Plants*. 2009; 1(29):30-8.
- [22] Rahbarian R, Sepehri Moghadam H, Sadoughi SD. [Effect of aqueous extract of *Launaea acanthodes* on open skin wound in diabetic rats (Persian)]. *Quarterly of the Horizon of Medical Sciences*. 2016; 22(1):1-11. [DOI:10.18869/acadpub.hms.22.1.1]
- [23] Rami M, Habibi A, Khajehlandi M. [Effect of 6-weeks of endurance training on the activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes in the hippocampus of experimental diabetic male Wistar rats (Persian)]. *Journal of Shaeed Sadoughi University of Medical Sciences*. 2018; 26(6):483-94.
- [24] Karimi MN, Abbasalipourkabir R, Arab Sadeghabadi Z, Ziamajidi N. [The level of gene expression of Bax and Bcl-2 and the activity of caspase 3 in the liver tissues of normal, type 1 and type 2 diabetic rats before and after treatment with aqueous extract of garlic (Persian)]. *Journal of Shaeed Sadoughi University of Medical Sciences*. 2017; 25(7):547-55.
- [25] Ghojagh D, Deylam Katoli H, Habibi Nodeh M. [Level of glutathione peroxidase activity and carbonyl and malondialdehyde levels in erythrocyte of diabetic rats (Persian)]. *Quarterly of the Horizon of Medical Sciences*. 2013; 19(3):179-83.
- [26] Kryvko Y, Mateshuk-Vatseba L, Savka I, Łuszczewska-Sierakowska I, Wawrzyniak A, Radzikowska E, et al. Ultrastructural haemomicrocircular channel links of rat testicle in streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*. 2014; 8(2):86-89. [DOI:10.26444/jpcrr/71474]
- [27] Samarghandian S, Afshari R, Sadati A. Evaluation of lung and bronchoalveolar lavage fluid oxidative stress indices for assessing the preventing effects of safranal on respiratory distress in diabetic rats. *The Scientific World Journal*. 2014; 2014:1-6. [DOI:10.1155/2014/251378] [PMID] [PMCID]

This Page Intentionally Left Blank