

اثرات درمانی عصاره آبی- الکی برگ اسفناج آبی در مقابل سمیت ناشی از مصرف بوسولفان بر پارامترهای باروری در موش صحرائی نر؛ یک مطالعه کارآزمایی بالینی تصادفی شاهددار

دکتر محمدرضا سلحشور^۱، دکتر شیوا روشنخواه^۱، دکتر امیر جلالی^۲، دکتر امیر عبدالملکی^{۳*}

۱. دانشیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.
۲. دانشیار گروه پرستاری، پژوهشکده سلامت، دانشکده پرستاری، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.
۳. دانشجوی دکتری علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۰۵

خلاصه

مقدمه: داروی بوسولفان جهت معالجه سرطان، به علت خواص اکسیداسیونی و تولید رادیکال‌های آزاد سبب اختلال در پارامترهای باروری مردانه می‌شود و برگ گیاه اسفناج آبی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر برگ اسفناج آبی بر بهبود آسیب‌های دستگاه تناسلی نر ناشی از بوسولفان انجام شد.

روش کار: این مطالعه کارآزمایی بالینی تصادفی شاهددار در سال ۱۳۹۸ بر روی ۴۸ موش صحرائی نر نژاد ویستار انجام شد. نمونه‌ها در ۸ گروه شامل: نرمال سالین، بوسولفان، عصاره برگ اسفناج آبی با دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و عصاره + بوسولفان قرار گرفتند. تیمار روزانه و طی ۲ ماه به صورت داخل صفاقی انجام شد. پارامترهای اسپرم با استفاده از تکنیک‌های رنگ‌سنجی و توسط میکروسکوپ نوری، سطح مالون دی‌آلدهید بیضه توسط اسپکتروفتومتر، ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام و تستوسترون با روش الیزا و ارتفاع لایه سمینی فرس از طریق میکروسکوپ نوری و نرم‌افزار موتیک اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۰) و آزمون تکمیلی توکی انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: مقادیر پارامترهای اسپرم، هورمون تستوسترون و ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام در گروه کنترل منفی نسبت به کنترل مثبت به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0/01$). تیمار توسط عصاره و عصاره + بوسولفان در تمامی دوزها، به طور معنی‌داری موجب افزایش تمامی پارامترهای ذکر شده نسبت به گروه کنترل منفی شد ($p < 0/01$). در پارامترهای بررسی شده در گروه عصاره به تنهایی، تغییر معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مثبت مشاهده نشد ($p > 0/05$).

نتیجه‌گیری: عصاره برگ اسفناج کیفیت اسپرم را افزایش داده و اثرات سوء بوسولفان را بر روی پارامترهای تولید مثلی نر بهبود می‌بخشد.

کلمات کلیدی: اسفناج آبی، باروری، بوسولفان، کارآزمایی بالینی

* نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر امیر عبدالملکی؛ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. تلفن: ۰۸۳۳-۸۳۵۹۷۹۵؛ پست الکترونیک: enjyanatomy@gmail.com

مقدمه

شیمی‌درمانی، روشی متداول در درمان سرطان است. داروهای شیمی‌درمانی علاوه بر اثرات مفید در مهار فعالیت سلول‌های سرطانی، بر سلول‌های سالم همچون سلول‌های دودمان اسپرماتوژنیک نیز تأثیر می‌گذارند که ممکن است موجب ناباروری شوند (۱). داروی بوسولفان^۱ از داروهای این رده می‌باشد که در دوزهای پایین جهت درمان سرطان‌های خون و تخمدان و همچنین در دوزهای بالا در بیماران تحت پیوند مغز استخوان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲). داروی بوسولفان با اثر مستقیم مهاری در تقسیم سلولی، بیشترین تأثیر خود را بر روی سلول‌های اسپرماتوگونی اعمال می‌کند (۳). این دارو می‌تواند باعث ناهنجاری‌های کروموزومی و بروز جهش‌های کشنده در اسپرم شود (۴). طبق گزارش دهقانی و همکاران (۲۰۱۹)، مصرف این دارو باعث اختلال در عملکرد غدد جنسی و کاهش سلول‌های دودمان اسپرماتوژنیک و سوماتیک در بیضه موش‌ها شده است (۵). اختلال در اسپرماتوژنز متعاقب تجویز بوسولفان، به‌واسطه تأثیر مخرب آن بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی اعمال می‌شود (۶). استعمال بوسولفان جهت تخلیه لوله‌های سمینی فرس از سلول، مدت زمان زیادی است که مورد توجه گرفته است تا عملکرد سلول‌های بنیادی زایا بدین طریق بررسی شود (۷). داروی بوسولفان با تولید رادیکال‌های آزاد، مرگ سلولی را القاء می‌کند (۸، ۹).

شرایط استرس اکسیداتیو^۲ به‌دلیل تولید رادیکال‌های آزاد، باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)^۳ می‌شود و در نهایت موجب اکسیداسیون لیپیدها می‌گردد (۱۰). این پدیده باعث تجزیه DNA و غیرفعال‌سازی پروتئین‌های خاص و حذف غشای بیولوژیک سلول می‌شود (۱۱). سبزیجات با دارا بودن فیبر بالا و انرژی کم، سرشار از مواد مغذی مانند ویتامین‌ها، مواد معدنی و پروتئین‌ها هستند (۱۲).

در حال حاضر، مردم در بسیاری از قسمت‌های مختلف جهان از سبزیجات به‌عنوان گیاهان دارویی برای پیشگیری و معالجه برخی بیماری‌ها استفاده می‌کنند (۱۳). گیاهان دارویی دارای منابع مهمی از مواد شیمیایی با اثرات درمانی بالقوه هستند (۱۴). اسفناج آبی^۴، گیاهی دارویی متعلق به خانواده Convolvulaceae بوده که در سراسر جنوب غربی آسیا کشت داده می‌شود (۱۵، ۱۶). به‌دلیل رشد سریع، این گیاه در شالیزارهای برنج، استخرهای ماهی و کانال‌های زهکشی شده به‌راحتی رشد می‌یابد (۱۷). برگ اسفناج آبی به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی، گیاهی مؤثر برای درمان برخی بیماری‌ها از جمله بیماری کبدی و کلیوی می‌باشد (۱۸). استفاده از برگ این گیاه در طب سنتی در مطالعات مختلفی مورد تأیید قرار گرفته است. آنالیزهای بیوشیمیایی عصاره برگ اسفناج آبی، به‌خاطر وجود عناصر فعال گیاهی، این عصاره را به داروی مؤثری در طب سنتی تبدیل کرده است (۲۰). مکمل‌های غذایی موجود در برگ اسفناج آبی، میزان آنتی‌اکسیدان‌ها را در بدن افزایش داده، بنابراین از تولید استرس اکسیداتیو، فرآیند پراکسیداسیون لیپید و آسیب DNA ناشی از ترکیبات اکسیداتیو جلوگیری می‌کند (۲۱).

استرس اکسیداتیو با توجه به افزایش روند آپوپتوز در سلول‌ها، کاهش تقسیمات سلولی، آسیب جدی به غشای سلول‌ها و اندامک‌های درون سلول می‌تواند آسیب‌های مخربی در مواجهه با سلول‌های اسپرم در پی داشته باشد. استرس اکسیداتیو می‌تواند روند تولید اسپرم‌ها را مختل و ضمن کاهش ایجاد اسپرماتوزوئیدهای سالم، میزان باروری را نیز کم کند (۲۲). تجویز آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند اثرات بسیار مثبتی بر تعداد اسپرم‌ها، میزان زنده بودن و حرکت آنها بگذارد (۲۳). به‌نظر می‌رسد عصاره برگ اسفناج آبی به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان می‌تواند خنثی‌کننده استرس‌های اکسیداتیو بر روی اسپرم‌ها و مانع کاهش تعداد و حرکت سریع آنها و در عین حال ایجاد اسپرم‌هایی با مورفولوژی بد شود که ناشی از عوامل اکسیداسیون است (۲۴).

¹ Busulphan

² Stress oxidative

³ Reactive oxygene specious

⁴ Water spinach

رطوبت نسبی $50 \pm 5\%$ ، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دسترسی به آب و غذای آزاد نگهداری شدند. هر ۸ حیوان در یک قفس استاندارد قرار داده شد. تمام مراحل مطالعه بر اساس بیابیه هلسینکی، قوانین تحقیقاتی کار با حیوانات و مصوبه کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام شد (کد اخلاق: IR.KUMS.REC.1397.305) (۱۴).

گروه‌های مورد مطالعه و تیمار حیوانات

در این مطالعه کارآزمایی بالینی تصادفی شاهددار، حیوانات آزمایشگاهی بر اساس مطالعات مشابه (فرنس)، شامل ۴۸ موش صحرایی به صورت تصادفی با استفاده کارت تصادفی بدون جایگزینی به ۸ گروه (۶ موش در هر گروه) به شرح زیر تقسیم شدند: گروه ۱ (کنترل مثبت)، نرمال سالین برابر میزان عصاره تجویز شده در سایر گروه‌ها به صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. گروه ۲ (کنترل منفی) داروی بوسولفان با دوز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۸ هفته، به منظور القاء آسیب به دستگاه تولیدمثلی هر روز در ساعت ۹:۴۵ صبح به صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. گروه‌های ۳-۵ (دریافت کننده عصاره) عصاره آبی - الکلی برگ اسفنج آبی به ترتیب در دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت خوراکی، روزانه به مدت ۸ هفته در ساعت ۱۰:۰۰ صبح به صورت گاوژ به حیوانات داده شد. گروه‌های ۶-۸ (دریافت کننده عصاره و دارو) که در آن ابتدا داروی بوسولفان با دوز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در ساعت ۹:۴۵ صبح به صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد و سپس عصاره آبی - الکلی برگ اسفنج آبی به صورت خوراکی در دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت خوراکی و از طریق گاوژ، هر روز رأس ساعت ۱۰:۰۰ صبح به مدت ۸ هفته به موش‌ها داده شد (۳، ۲۵).

تهیه نمونه‌ها

پس از پایان دوره تیمار، موش‌ها با تزریق داخل صفاقی کتامین هیدروکلراید (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند. ۳ میلی‌لیتر نمونه خونی به طور مستقیم از قلب گرفته شد. این نمونه به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷

ممکن است برگ اسفنج آبی به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی، قادر به محافظت از پارامترهای تولیدمثلی مرد در برابر استرس‌های اکسیداتیو از جمله استرس اکسیداتیو ناشی از مصرف داروی بوسولفان باشد. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در خصوص اثرات عصاره برگ اسفنج آبی بر روی آسیب‌های ناشی از مصرف داروی بوسولفان در پارامترهای تولید مثلی در جنس مذکر صورت نگرفته است، بنابراین مطالعه حاضر با هدف ارزیابی تأثیر عصاره برگ اسفنج آبی در برابر آسیب به پارامترهای تولیدمثل در موش‌های صحرایی نر ناشی از مصرف بوسولفان انجام شد.

روش کار

این مطالعه کارآزمایی بالینی تصادفی شاهددار در سال ۱۳۹۸ بر روی ۴۸ موش صحرایی نر نژاد ویستار در گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام شد.

آماده‌سازی عصار گیاهی

برگ خشک اسفنج آبی از مرکز گیاهان دارویی (داروخانه طبیعی سلامتکده طب سنتی، دانشکده طب سنتی دانشگاه تهران) خریداری و توسط گیاه‌شناس مورد بررسی و تأیید قرار گرفت. برگ‌های خریداری شده توسط آسیاب برقی پودر شدند. ۱۰۰ گرم از پودر به اتانول ۷۰٪ اضافه شد. محلول به دست آمده در حمام آب گرم (۳۶ درجه سانتی‌گراد) و در شرایط تاریکی قرار داده شد. در ادامه محلول از فیلتر کاغذی و پمپ خلأ عبور داده شد. جهت به دست آوردن محلول اضافی، محلول در دستگاه روتاتور قرار داده شد. مراحل جداسازی تا به دست آمدن عصاره ادامه یافت. عصاره در نرمال سالین جهت به دست آوردن غلظت‌های (دوز) مورد مطالعه رقیق شد (۱۴).

حیوانات آزمایشگاهی

در این مطالعه تجربی، ۴۸ موش صحرایی ماده بالغ از نژاد ویستار (۸ هفته، وزن ۲۵۰-۲۲۰ گرم) از انستیتو رازی ایران خریداری شد. از یک هفته قبل از شروع مطالعه، موش‌ها در لانه حیوانات دانشکده پزشکی در شرایط آزمایشگاهی، دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد با

اسپرم شمارش شد. در تمام گروه‌ها، ارزیابی پارامترهای اسپرم توسط دو نفر متخصص واجد شرایط انجام شد تا میزان خطا به حداقل برسد (۱۱).

میزان زنده بودن اسپرم‌ها

از رنگ اتوزین جهت تشخیص اسپرم‌های زنده از مرده استفاده شد. اساس این تکنیک رنگ‌آمیزی به جذب رنگ توسط غشای سلول‌های مرده و دفع آن توسط غشای سلول‌های زنده می‌باشد. حدود ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون با محلول اتوزین (حدود ۲۰ میکرولیتر) مخلوط شد. پس از ۵-۲ دقیقه، بخشی از مخلوط روی یک لام نئوبار ریخته شد. توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰، اسپرم‌های زنده فاقد رنگ و اسپرم‌های مرده به رنگ صورتی مشاهده شدند (۱۲).

میزان اسپرم‌ها با مورفولوژی طبیعی

مورفولوژی نرمال اسپرم‌ها از طریق بررسی اسمیر اسپرم‌های جدا شده از اپیدیدیم مورد بررسی قرار گرفت. از روش رنگ‌آمیزی اتوزین / نیگروزین برای ارزیابی مورفولوژی نرمال اسپرم‌ها استفاده شد. یک قطره از اتوزین به سوسپانسیون سلولی اضافه و سپس مخلوط شد. اسلایدها توسط میکروسکوپ نوری (بزرگ‌نمایی ۴۰) مشاهده شدند. در مجموع ۴۰۰ اسپرم قرار گرفته روی اسلایدها (۴۰۰۰ سلول در هر گروه) از نظر بی‌نظمی‌های سر و دم مورد مطالعه قرار گرفتند (۱۰).

محاسبه تعداد اسپرم

جهت تعیین تعداد اسپرم‌ها، ۴۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم توسط محلول فرمالدهید (Sigma, USA) رقیق شد. حدود ۱۵ میکرولیتر از محلول حاوی اسپرم رقیق شده توسط یک پیت پاستور به هموسیتومتر منتقل گشت. اسپرم‌ها در هر ۲۵۰ مربع کوچک هموسیتومتر با استفاده از عدسی ۴۰ بررسی و ارزیابی شدند (۱۰).

بررسی مورفومتریک لایه زایا در لوله‌های سمینفروس

بافت‌های بیضه در نرمال سالین شسته و در فرمالین ۱۰٪ فیکس شدند. عملیات آب‌گیری با استفاده از غلظت‌های صعودی الکل انجام شد. نمونه‌ها توسط

درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس سانتریفوژ شد (۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ g (شتاب گرانشی)). سرم خون جداسازی شد و بخشی از آن جهت ارزیابی میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و هورمون تستوسترون در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد فریز شدند. دیواره قدامی شکم حیوان باز شد. بیضه‌ها از حفره شکم خارج و دم اپیدیدیم هر دو بیضه از آنها جدا شد و در محیط کشت (FBS / F-12) قرار گرفتند. بیضه چپ در محلول فرمالین ۱۰٪ جهت ارزیابی بافت‌شناسی و مورفومتریک فیکس شدند. بیضه راست نیز برای آنالیز سطح مالون دی‌آلدهید مورد استفاده قرار گرفت (۱۰).

جمع‌آوری اسپرم

دم‌های اپیدیدیم‌ها در ظرف پتری دیش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محلول نمکی متعادل Hank در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تکه‌تکه شد تا اسپرم‌ها درون محلول بافر معلق شوند. ۱۵ دقیقه بعد، دم اپیدیدیم‌ها برداشته شد و سوسپانسیون به‌دست آمده جهت توزیع سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. برای اطمینان از حضور اسپرم‌ها در محلول به‌دست آمده، سوسپانسیون حاصل با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ مورد بررسی قرار گرفت (۱۲).

تحرک اسپرم‌ها

این ویژگی بر اساس پروتکل‌های سازمان جهانی بهداشت (WHO)^۱ در چهار سطح مورد ارزیابی قرار گرفت: (الف) حرکت سریع پیش‌رونده در خط مستقیم، (ب) حرکت پیش‌رونده آهسته در خط مستقیم یا غیرمستقیم، (ج) عدم تحرک پیش‌رونده و (د) عدم تحرک. از آنجا که حرکت سریع پیش‌رونده در القای باروری اهمیت بیشتری دارد، بنابراین در این مطالعه تنها این حرکت مورد ارزیابی قرار گرفت. تحرک اسپرم توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰*۱۰ میدان دید بررسی شد؛ بدین‌منظور، حدود ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون روی اسلاید قرار داده شد و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ توسط میکروسکوپ نوری (شرکت Olympus، ژاپن) بررسی شد. شمارش اسپرم‌ها از طریق دستگاه شمارش سلول انجام شد و در هر نمونه حدود ۱۰۰

¹ World Health Organization

باشد. این کیت حاوی یک معرف آماده استفاده، بافر ۱۰۰X، پودر رنگ، محلول سوسپانسیون واکنش استاندارد و میکروپلیت ۹۶ چاهکی بود. در این روش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام معادل مقداری آنتی‌اکسیدان موجود در نمونه بود که با اسید اسکوربیک به‌عنوان استاندارد مقایسه شد. حساسیت کیت برابر با ۰/۱ میلی‌مول و جذب نهایی در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد (۱۹).

تحلیل آماری

پس از کسب اطمینان از طبیعی بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف اسمیرنوف، تبعیت از توزیع نرمال داده‌ها در هر گروه انجام شد که در همه گروه‌ها متغیرها از توزیع نرمال تبعیت می‌کردند ($p > 0/05$). بنابراین برای تحلیل آماری از آزمون‌های پارامتریک استفاده شد که با توجه به تعداد گروه‌ها و برقرار بودن معیارهای لازم از تحلیل واریانس یک‌طرفه استفاده شد و با توجه به معنی‌دار بودن ($p < 0/01$) اختلاف میانگین در هر سه متغیر در بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی (تکمیلی) توکی استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۰) انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میزان تحرک، تعداد کل و زنده بودن اسپرم‌ها
تجویز داروی بوسولفان منجر به کاهش معنی‌دار در میزان زنده بودن، تعداد کل و تحرک پیشرونده اسپرم‌ها در گروه کنترل منفی (دریافت کننده بوسولفان) در مقایسه با گروه کنترل مثبت (دریافت کننده نرمال سالین) شد ($p < 0/01$). در میزان زنده بودن، تعداد کل و تحرک پیشرونده اسپرم‌ها در گروه‌های دریافت کننده عصاره هیچ اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مثبت مشاهده نشد ($p > 0/05$). همچنین مقادیر این سه متغیر در همه گروه‌های دریافت کننده عصاره و عصاره + بوسولفان نسبت به گروه کنترل منفی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0/01$) (جدول ۱).

زایلین شفاف‌سازی شده و در پارافین غوطه‌ور شدند. برش‌های نازک (۴ میکرومتر) با استفاده از دستگاه میکروتوم (ساخت کشور آلمان) زده شد و نمونه‌ها با استفاده از روش هماتوکسیلین و اتوزین رنگ‌آمیزی شدند. ۲۰ برش عرضی از هر بلوک بافتی آماده شد و برش‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ انتخاب و به‌صورت راندم از ۳ قسمت آنها عکسبرداری شد. برای هر لوله قطر لایه زایا توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ اندازه‌گیری شد. حداقل ۵۰ لوله از هر ناحیه اندازه‌گیری شد. قطر هر لایه زایا از طریق دوربین و نرم‌افزار موتیک (Moticam 2000, Spain) اندازه‌گیری شد (۱۲).

سطح تستوسترون

به‌منظور دستیابی به سرم خون، نمونه‌ها در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. نمونه سرم در فریزر (۱۸۰- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. سطح تستوسترون سرم با استفاده از روش الیزا^۱ و بر اساس پروتوکل کارخانه سازنده (Abcam, USA) انجام شد (۱۱).

اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدهید^۲ بافت بیضه

سطح مالون دی‌آلدهید در بافت بیضه راست به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید مورد بررسی قرار گرفت. همگن‌سازی نمونه‌ها توسط بافر حاوی محلول ۱/۱۵٪ کلرید پتاسیم انجام شد و نمونه‌ها به‌ترتیب در مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (۱۵۰۰ g) (شتاب گرانشی) شدند. نمونه‌های هموزن به مخلوط حاوی سدیم دودسیل سولفات، اسید استیک (pH=۳/۵)، اسید تیوباربیتوریک و آب مقطر اضافه شدند. پس از جوشیدن مخلوط به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سانتریفیوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه (۳۰۰۰ g)، میزان جذب سوپرناتانت با استفاده از اسپکتروفتومتری با طول نوری ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۹).

اندازه‌گیری میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام^۳

برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام از کیت ZellBioGmbH-Germany استفاده شد. مینی این تکنیک بر اساس احیای رنگ‌سنجی اکسیداسیونی می-

¹ ELISA

² MDA

³ Total antioxidant capacity

تعداد اسپرم‌ها با مورفولوژی طبیعی

نسبت به گروه کنترل مثبت معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). با این حال، میزان اسپرم‌ها با مورفولوژی طبیعی در همه گروه‌های تحت درمان با عصاره و عصاره + بوسولفان در مقایسه با گروه کنترل منفی به‌طور معنی‌داری از خود افزایش نشان داد ($p < 0.01$) (جدول ۱).

تعداد اسپرم‌ها با مورفولوژی طبیعی به‌طور معنی‌داری در گروه کنترل منفی (دریافت کننده بوسولفان) نسبت به گروه کنترل مثبت (دریافت کننده نرمال سالین) کاهش یافته بود ($p < 0.01$). تغییرات تعداد اسپرم‌ها با مورفولوژی طبیعی در گروه‌های دریافت کننده عصاره

جدول ۱- اثرات بوسولفان و عصاره برگ اسفناج آبی بر روی پارامترهای اسپرم در موش‌های صحرایی نر

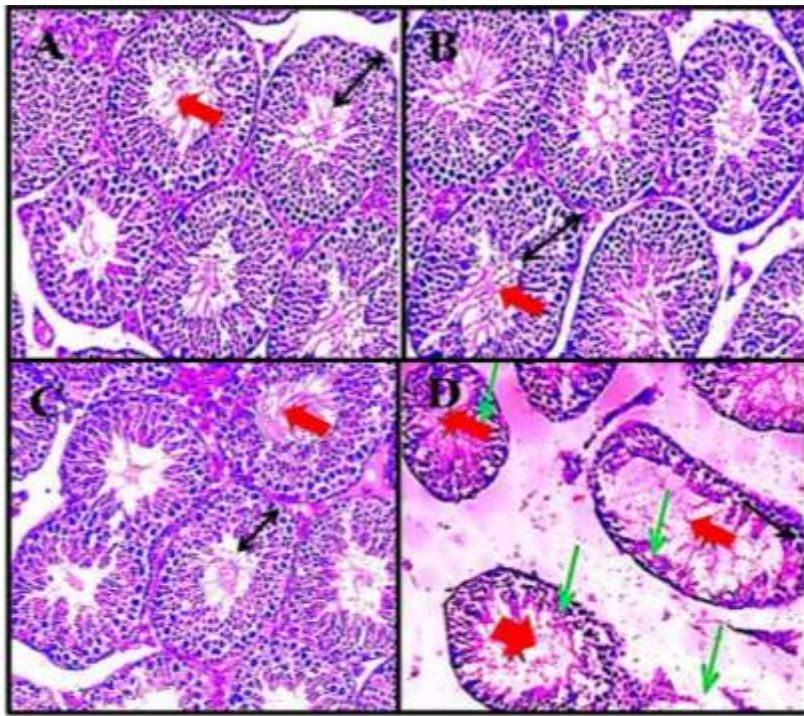
گروه‌ها	میانگین تعداد اسپرم‌ها (۱۰ ^۶)	میزان اسپرم‌های با حرکت زیاد (درصد)	میزان زنده بودن اسپرم‌ها (درصد)	میزان نرمال بودن اسپرم‌ها (درصد)
کنترل نرمال	۸/۹۶±۰/۴	۷/۴۲±۰/۴۵	۹۱/۲۲±۶/۴۲	۸۶/۵۴±۵/۴۲
کنترل بوسولفان	۳/۴۵±۰/۰۳*	۰/۰۶±۰/۳۴*	۴۲/۴۱±۱/۴۳*	۴۰/۳۴±۲/۳۲*
اسفناج ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم	۸/۲۵±۰/۱۲†	۷/۹۳±۰/۷۲†	۹۲/۳۱±۴/۷۵†	۸۳/۷۱±۳/۳۵†
اسفناج ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم	۸/۶۳±۰/۴†	۸/۳۳±۱/۵۳†	۹۶/۷۴±۵/۶۳†	۸۶/۶۱±۴/۷۸†
اسفناج ۱۰۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم	۹/۶۳±۰/۵†	۹/۷۲±۳/۲۷†	۹۹/۶۳±۵/۰۷†	۸۹/۷۷±۵/۲۶†
اسفناج+ بوسولفان ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم	۵/۷۸±۰/۲‡	۰/۸۳±۰/۰۳‡	۶۱/۷۸±۲/۹۸‡	۶۵/۱۱±۳/۳۳‡
اسفناج+ بوسولفان ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم	۵/۳۶±۰/۳‡	۲/۶۵±۰/۰۴‡	۶۹/۱۴±۳/۶۷‡	۶۳/۳۷±۳/۷۳‡
اسفناج+ بوسولفان ۱۰۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم	۴/۴۸±۰/۱‡	۲/۴۱±۰/۰۶‡	۷۲/۲۶±۳/۴۲‡	۶۴/۳۸±۲/۸۹‡

مقادیر متغیرها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشد. * تغییرات معنی‌دار در گروه کنترل منفی (دریافت کننده بوسولفان) در مقایسه با گروه کنترل مثبت (دریافت کننده نرمال سالین) ($p < 0.01$). † تغییرات معنی‌دار در گروه‌های دریافت کننده عصاره در مقایسه با گروه کنترل منفی ($p < 0.01$). ‡ تغییرات معنی‌دار در گروه‌های دریافت کننده عصاره + بوسولفان در مقایسه با گروه کنترل منفی ($p < 0.01$)

ارتفاع لایه زایا در لوله‌های سمینی فرس

در مقایسه با گروه کنترل مثبت مشاهده نشد ($p > 0.05$). ارتفاع لایه زایا در لوله‌های سمینی فرس در گروه‌های دریافت کننده عصاره و عصاره + بوسولفان به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل منفی افزایش یافته بود ($p < 0.01$) (جدول ۲، شکل ۱).

تجویز داروی بوسولفان در گروه کنترل منفی (دریافت کننده بوسولفان) در مقایسه با گروه کنترل مثبت (دریافت کننده نرمال سالین) باعث کاهش معنی‌دار در ارتفاع لایه زایا در لوله‌های سمینی فرس شد ($p < 0.01$). در ارتفاع لایه زایای لوله‌های سمینی فرس هیچ تغییر معنی‌داری در گروه‌های دریافت کننده عصاره



شکل ۱- اثرات داروی بوسولفان و عصاره برگ اسفناج آبی بر لوله‌های سمینی فرس (رنگ‌آمیزی H&E؛ بزرگ‌نمایی ۴۰۰). ساختار نرمال در لوله‌های سمینی فرس در گروه کنترل مثبت (A) (دریافت کننده نرمال سالیین)، گروه دریافت کننده عصاره (۱۰۰۰ میلی‌گرم / کیلوگرم) (B) و گروه دریافت کننده عصاره + بوسولفان (۱۰۰۰ میلی‌گرم / کیلوگرم عصاره) (C) مشاهده شد. کاهش ارتفاع لایه زایای سمینی فرس، تخریب سلول‌ها و کاهش تراکم اسپرم‌ها در گروه کنترل منفی (دریافت کننده بوسولفان) مشاهده شد (D). فلش‌های سیاه نشان‌دهنده ارتفاع لایه زایای لوله‌های سمینی فرس، فلش‌های قرمز نشان‌دهنده تراکم سلول‌های اسپرم و فلش سبز نشان‌دهنده بی‌نظمی در حاشیه ساختار لوله‌های سمینی فرس (تخریب غشاء) می‌باشند.

تستوسترون

تجویز داروی بوسولفان باعث کاهش معنی‌دار در سطح هورمون تستوسترون در گروه کنترل منفی (دریافت کننده بوسولفان) در مقایسه با گروه کنترل مثبت (دریافت کننده نرمال سالیین) شد ($p < 0.01$). در میزان هورمون تستوسترون در گروه‌های دریافت کننده عصاره نسبت به گروه کنترل مثبت هیچ تغییر معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$). علاوه بر این، سطح هورمون تستوسترون در تمام گروه‌های تحت تیمار با عصاره و عصاره + بوسولفان به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل منفی افزایش نشان داد ($p < 0.01$) (جدول ۲).

میزان مالون دی‌آلدهید بافت بیضه

میزان مالون دی‌آلدهید بافت بیضه در گروه کنترل منفی (دریافت کننده بوسولفان) نسبت به گروه کنترل مثبت (دریافت کننده نرمال سالیین) افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.01$). همچنین کاهش معنی‌داری در میزان مالون دی‌آلدهید در تمام گروه‌های دریافت

کننده عصاره و عصاره+بوسولفان نسبت به گروه کنترل منفی مشاهده شد ($p < 0.01$). از طرفی تجویز این عصاره فاقد هرگونه تأثیر معنی‌دار بر میزان مالون دی‌آلدهید در همه گروه‌های دریافت کننده عصاره نسبت به گروه کنترل مثبت بود ($p > 0.05$) (جدول ۲).

میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام

نتایج بررسی میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در گروه کنترل منفی (دریافت کننده بوسولفان) نسبت به گروه کنترل مثبت (دریافت کننده نرمال سالیین) کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.01$). افزایش معنی‌داری در سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در تمام گروه‌های دریافت کننده عصاره و عصاره + بوسولفان نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0.01$), در حالی که هیچ تأثیر معنی‌داری بر روی سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در تمام گروه‌های دریافت کننده عصاره نسبت به گروه کنترل مثبت مشاهده نشد ($p > 0.05$) (جدول ۲).

جدول ۲- اثرات بوسولفان و عصاره اسفناج آبی بر میزان تغییرات هورمون تستوسترون، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام، ارتفاع لایه ژرمینال لوله‌های سمینی فروس و میزان مالون دی‌آلدئید بیضه در موش‌های صحرایی نر

گروه‌ها	ارتفاع لایه ژرمینال (میکرومتر)	میزان هورمون تستوسترون (نانوگرم/میلی‌لیتر)	میزان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (میلی‌مول)	میزان مالون دی‌آلدئید بیضه (میکرومول)
کنترل نرمال	۵۲/۶۵±۲/۳۱	۰/۸۲±۰/۰۲	۴/۳۴±۰/۰۱	۶۵/۴۷±۲/۴۱
کنترل بوسولفان	۱۸/۷۴±۱/۲۹*	۰/۰۴±۰/۰۳*	۱/۹۸±۰/۰۲*	۱۳۰/۳۶±۶/۰۳*
اسفناج ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم	۴۷/۲۳±۳/۴۳†	۰/۷۴±۰/۰۲†	۴/۴۱±۰/۰۱†	۶۸/۰۸±۵/۶۳†
اسفناج ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم	۵۳/۳۴±۲/۴۱†	۰/۸۱±۰/۰۱†	۴/۴۲±۰/۰۲†	۶۶/۵۲±۴/۷۴†
اسفناج ۱۰۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم	۵۳/۶۳±۴/۳۱†	۱/۰۲±۰/۰۲†	۴/۳۷±۰/۰۱†	۶۹/۳۶±۲/۵۲†
اسفناج+ بوسولفان ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم	۲۹/۷۴±۲/۷۴¶	۰/۱۱±۰/۰۳¶	۱/۰۶±۰/۰۳¶	۹۹/۰۷±۳/۰۹¶
اسفناج+ بوسولفان ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم	۳۱/۹۴±۱/۳¶	۰/۱۹±۰/۰۲¶	۲/۶۷±۰/۰۱¶	۱۱۱/۶۸±۵/۷۱¶
اسفناج+ بوسولفان ۱۰۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم	۳۳/۶۵±۱/۲۸¶	۰/۲۱±۰/۰۱¶	۲/۰۶±۰/۰۲¶	۱۱۰/۳۵±۶/۸۲¶

مقادیر متغیرها به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشد. * تغییرات معنی‌دار در گروه کنترل منفی (دریافت کننده بوسولفان) در مقایسه با گروه کنترل مثبت (دریافت کننده نرمال سالین) ($p < 0/01$). † تغییرات معنی‌دار در گروه‌های دریافت کننده عصاره در مقایسه با گروه کنترل منفی ($p < 0/01$). ¶ تغییرات معنی‌دار در گروه‌های دریافت کننده عصاره + بوسولفان در مقایسه با گروه کنترل منفی ($p < 0/01$)

بحث

در مطالعه حاضر تجویز بوسولفان موجب کاهش میزان پارامترهای اسپرم، ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام، هورمون تستوسترون و ارتفاع لایه سمینی فروس در گروه کنترل منفی نسبت به کنترل مثبت شد. تیمار توسط عصاره برگ اسفناج آبی و عصاره برگ اسفناج آبی + بوسولفان در تمامی دوزها، به‌طور معنی‌داری موجب افزایش تمامی پارامترهای فوق (به‌جز سطح مالون دی‌آلدئید که کاهش یافت) نسبت به گروه کنترل منفی شد.

استرس اکسیداتیو به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوارض شیمی‌درمانی می‌تواند روند اسپرماتوژنز را مختل کرده، تولید اسپرماتوزوئیدهای سالم را کاهش داده و میزان باروری را کم کند (۲۲). بنابراین استفاده از ترکیبات بالقوه آنتی‌اکسیدانی در کنار مصرف داروهای شیمی‌درمانی ممکن است به‌طور چشمگیری مقاومت سلول‌ها در برابر رادیکال‌های آزاد را افزایش دهد (۲۶). بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، داروی بوسولفان اثرات مخربی بر بافت بیضه، پارامترهای اسپرم، توازن اکسیداسیون - آنتی‌اکسیداسیون و سطح هورمون تستوسترون دارد.

به‌نظر می‌رسد عصاره برگ اسفناج آبی به‌عنوان یک فیتواستروژن، اثرات سوء داروی بوسولفان در سیستم تولید مثل مردان را کاهش دهد و با کاهش میزان مالون دی‌آلدئید بیضه و سطح پراکسیداسیون لیپید،

آسیب‌های وارد شده به بیضه را به شکل معنی‌داری ترمیم کند. این عصاره حاوی ترکیبات زیست‌سازگار مهم مانند قندها، اسیدهای چرب، مواد معدنی و ویتامین‌هاست. مطالعات اخیر منجر به کشف خواص ضدالتهاب، ضد میکروب و آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ اسفناج آبی شده است (۱۷). با توجه به خاصیت لیپوفیلی این عصاره، پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از (ترت-بوتیل هیدروپراکسید)^۱ در اسپرم‌ها می‌تواند از طریق واکنش فنتون مهار شود (۱۹). بنابراین، عصاره برگ اسفناج آبی با ماهیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند مانع از تولید ROS که در آن سطح مالون دی‌آلدئید بیضه کاهش و میزان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد، گردد.

بر اساس نتایج منتشر شده، به‌نظر می‌رسد عصاره برگ اسفناج آبی می‌تواند پارامترهای تولید مثل جنس نر را بازیابی کند و با القای روند نزولی سطح مالون دی‌آلدئید بیضه، استرس اکسیداتیو را کاهش دهد. در اسپرماتوژنز، اسپرم‌ها مقدار زیادی سیتوپلاسم را از دست می‌دهند و از عوامل آنتی‌اکسیدانی سلولی خالی می‌شوند. بنابراین نسبت به سایر سلول‌های سوماتیک، حساسیت بالاتری نسبت به افزایش ROS دارند (۱۱). پراکسیداسیون در غشای سلولی و اندامک‌ها به‌عنوان اولین نتیجه حمله ROS به سازه‌های غشایی در نظر گرفته می‌شود (۱۰).

¹ tert-butyl-hydro peroxide

روند مرگ سلولی شود. از جمله این عوامل می‌توان به فعال‌سازی کاسپازها، کاهش سنتز آدنوزین تری‌فسفات، رهاسازی ROS مزاد، افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی و انتقال کلسیم میتوکندری به سیتوزول اشاره نمود (۱۰). به‌نظر می‌رسد داروی بوسولفان با افزایش بیان رتینوئیک اسید و mRNA کیناز مرتبط با سلول‌های ژرمینال جنسی مرد می‌تواند باعث آسیب DNA و تخریب سلول شود (۳۰). بر اساس نتایج مطالعات بهمن‌پور و همکاران (۲۰۱۷)، تجویز بوسولفان در موش‌های نر نژاد ویستار می‌تواند تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتیدها، لایدیگ و سرتولی را کاهش دهد که با نتایج حاضر همسو بود (۳۱).

افزایش سطح رادیکال‌های آزاد مربوط به تجویز بوسولفان می‌تواند سلول‌های سرتولی را تخریب کرده و با از بین رفتن سلول‌های اپی‌تلیالی، پل‌های سیتوپلاسمی را حذف کند (۳). به نظر می‌رسد بوسولفان تعداد سلول‌های نابالغ سرتولی را افزایش داده و تولید سیتوکراتین ۱۸ را در اسپرماتوژنز مختل می‌کند، بنابراین میزان ناباروری را افزایش می‌دهد (۳۲). کاهش تحرک اسپرم‌ها متعاقب تماس با بوسولفان می‌تواند به‌دلیل تأثیر این دارو بر DNA یا اختلال در عملکرد میتوکندری به‌عنوان یک اندامک مهم درگیر در تحرک اسپرم و تأمین آدنوزین تری‌فسفات باشد (۸).

بر اساس مطالعات انجام شده، اثرات مفید برگ اسفناج آبی به خاصیت آنتی‌اکسیدانی و همچنین افزایش پتانسیل سیستم دفاعی بدن در برابر فعالیت رادیکال‌های آزاد برمی‌گردد (۱۵، ۱۷). عصاره مذکور، غشای سلولی را تثبیت می‌کند و با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها از نشت آنزیم‌ها جلوگیری می‌نماید (۲۰). نتایج مطالعه آهنمن و همکاران (۲۰۱۳)، نشان داد که تجویز عصاره برگ اسفناج آبی می‌تواند پارامترهای اسپرم مانند تعداد، تحرک و میزان زنده بودن را در موش‌های دیابتی بهبود بخشد که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت (۲۴). در حقیقت، اسفناج آبی می‌تواند از تشکیل رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری کند (۱۵). اسفناج آبی حاوی ویتامین C، E و آرژنین می‌باشد (۱۷). نقش اصلی این عصاره در حذف سمیت موجود در

به‌نظر می‌رسد آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند عصاره برگ اسفناج آبی، سموم و رادیکال‌های آزاد موجود در اطراف سلول‌ها را حذف کرده تا مهار پراکسیداسیون لیپیدها و محافظت از ساختارهای بیوشیمیایی سلول شکل بگیرد (۱۵).

در مطالعه حاضر در گروه کنترل منفی (دریافت‌کننده بوسولفان)، تمامی پارامترهای اسپرم در مقایسه با گروه کنترل مثبت به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین افزایش معنی‌داری در تمام پارامترهای اسپرم در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره و عصاره + بوسولفان نسبت به گروه کنترل منفی مشاهده شد. اسپرماتوژنز فرآیندی است که تحت تأثیر عوامل مخرب بی‌شماری قرار دارد. مهم‌ترین این عوامل، استرس اکسیداتیو است که در نهایت می‌تواند باعث نازایی مردان شود (۲۷). این حالت به تجمع ROS در سیستم جنسی برمی‌گردد (۱۰). اثرات مهاری ROS بر سنتز DNA و RNA و عملکرد میتوکندری مشاهده شده است (۱۱). به‌نظر می‌رسد که استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط بوسولفان باعث توقف تقسیم سلولی و ناهنجاری در تمایز اسپرم‌ها و در نتیجه کاهش سلول‌های دودمان اسپرماتوژنیک می‌شود (۲۷). یافته‌های آتکن و همکار (۲۰۰۶)، نتایج مطالعه حاضر را تأیید می‌کند که استرس اکسیداتیو می‌تواند اسپرماتوژنز را مختل کرده و باعث ایجاد گامت‌های ناقص همراه با کروماتین بازسازی شده شود (۲۹). بر این اساس، رده سلولی دودمان اسپرماتوژنز توسط رادیکال‌های آزاد مورد حمله قرار گرفته و در نهایت ممکن است منجر به کاهش تعداد اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتوزوآ شود (۲۹).

کاهش تمام پارامترهای اسپرم در گروه دریافت‌کننده بوسولفان (کنترل منفی) می‌تواند به افزایش پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از استرس اکسیداتیو مربوط باشد. این پدیده ممکن است ماهیت فیزیولوژیک غشای سلولی را تغییر داده و منجر به از بین رفتن اسپرم‌های انتقالی به اپیدیدیم شود (۳۰). مقادیر بالای ROS باعث آسیب به میتوکندری شده و پروتئین‌های آپوپتوزی را در فضای بین غشایی آزاد می‌کند. افزایش عوامل فعال‌کننده آپوپتوز، می‌تواند منجر به فعال شدن

استروئیدهای بیضه نیز نقش اساسی داشته باشد. علاوه بر این، برگ اسفناج آبی با جلوگیری از کاهش گلوکوتائون و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند اثرات منفی استرس اکسیداتیو و توانایی سلول در غلبه بر شرایط استرس اکسیداتیو را غیرفعال کند. مطالعه گوالا و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد فیتواستروژن‌هایی مانند برگ اسفناج آبی می‌توانند به گیرنده‌های استروژن بیضه متصل شوند و اسپرماتوژنز را از طریق افزایش لایه‌های اپی‌تلیال و قطر لوله‌های منی‌ساز تحریک کنند (۳۸) که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت. به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آسیب‌های باروری در موش‌های صحرایی نر می‌تواند توسط آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی مانند عصاره برگ اسفناج آبی کاهش یابد؛ بنابراین ممکن است این عصاره بتواند برخی از اختلالات تولید مثلی جنس نر در اثر مصرف داروی شیمی‌درمانی بوسولفان را بهبود بخشد.

مطالعه حاضر قطعاً با محدودیت‌ها و مشکلاتی مواجه بود. رفرنس‌های بسیار کمی در مورد خواص اسفناج آبی و به‌خصوص اثرات آن بر روی اسپرم‌ها و در مواجهه با موارد اکسیداسیونی وجود داشت. با توجه به محدودیت‌های مالی در دانشگاه و کشور، امکان بررسی مکانیسم‌های ملکولی بیشتر در مورد عملکرد بوسولفان و همچنین عصاره برگ اسفناج بر روی پارامترهای اسپرم فراهم نشد. تعدادی از حیوانات مدتی پس از تجویز بوسولفان می‌مردند که از مطالعه خارج و با موش‌های دیگر جایگزین می‌شدند. پیشنهاد می‌شود مطالعات بعدی در این زمینه با بررسی مکانیسم‌های ملکولی عملکرد بوسولفان و عصاره برگ اسفناج بر روی پارامترهای اسپرم انجام شود. همچنین به بررسی اثرات ضد آپوپتوتیکی و ضدالتهابی احتمالی این عصاره بر روی اسپرم‌ها نیز پرداخته شود.

نتیجه‌گیری

بوسولفان به‌عنوان یک داروی شیمی‌درمانی به‌دلیل خواص اکسیداسیونی می‌تواند باعث ایجاد نواقصی در برخی از پارامترهای تولید مثلی موش‌های نر که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند، شود. عصاره برگ

بدن جانداران، می‌تواند به‌علت مهار تولید رادیکال‌های آزاد توسط خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن باشد (۳۳). تجویز عصاره برگ اسفناج آبی می‌تواند بیان متالوپروتئینازهای ماتریکس و عوامل التهابی مانند $TNF-\alpha$ ، $NK-\beta$ ، $IL-1\beta$ و $IL-6$ را مهار کند. همچنین به‌نظر می‌رسد تجویز این عصاره با سرکوب کاسپاز ۳ و بیان فاکتور $TNF-\alpha$ اثرات ضد آپوپتوزی و سایتوپروتکتیو^۱ خود را اعمال کند (۳۴). عصاره برگ اسفناج آبی، می‌تواند با ارتقاء عملکرد سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی درون اسپرم (همچون سوپراکسید دیسموتاز، گلوکوتائون پراکسیداز و کاتالاز) نقش مهمی در تقویت تحرک و زنده ماندن این سلول‌ها داشته باشد (۳۵).

در مطالعه حاضر سطح تستوسترون سرم و ضخامت لایه زایای لوله‌های سمی‌فروز در گروه دریافت‌کننده بوسولفان (کنترل منفی) در قیاس با گروه کنترل مثبت به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین افزایش معنی‌داری در سطح هورمون تستوسترون و ارتفاع لایه زایا لوله‌های سمینی‌فروس در تمامی گروه‌های دریافت‌کننده عصاره و عصاره + بوسولفان نسبت به گروه کنترل منفی مشاهده شد. علاوه بر این، در بررسی داده‌های بافتی، حذف فرم طبیعی و نظم سلول‌های قرار گرفته روی دیواره‌های لوله‌های منی‌ساز مشاهده شد که در نهایت منجر به ایجاد واکوئل‌ها در گروه کنترل منفی شده است. به‌طور کلی گسترش واکوئل‌ها در بیضه می‌تواند نتیجه روند استرس اکسیداتیو باشد. داروی بوسولفان می‌تواند به‌عنوان یک عامل آلکیل‌کننده، منجر به آسیب DNA و کاهش ضخامت لایه سمینی‌فروس شود (۳۶). نتایج بررسی‌های وحدتی و همکاران (۲۰۱۵) در راستای نتایج مطالعه حاضر بود که نشان داد تجویز بوسولفان می‌تواند قطر لوله‌های منی‌ساز، تعداد و تحرک اسپرم، ضخامت اپی‌تلیال لوله‌های منی‌ساز و حیات اسپرم‌ها را کاهش دهد و از طرف دیگر تعداد اسپرم‌های غیرطبیعی را زیاد کند (۳۷).

عصاره برگ اسفناج آبی به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی، نه تنها ممکن است پراکسیداسیون لیپیدها و استرس اکسیداتیو بیضه را مهار کند، بلکه می‌تواند در تولید

¹ Cytoprotective

ممکن است دلیل اصلی اثرات مفید آن در ارتقای پارامترهای تولید مثلی باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی که ما را در این طرح یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

اسفناج آبی می‌تواند کیفیت، حیات، مورفولوژی طبیعی اسپرم، ارتفاع لوله‌های منی‌ساز، میزان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی، تحرک و تعداد اسپرم‌ها را افزایش داده و میزان مالون دی‌آلدهید بافت بیضه را کاهش دهد. بنابراین عصاره برگ اسفناج آبی می‌تواند برای درمان مردان بیماری که به دلیل تجویز داروی بوسولفان به جهت انجام شیمی‌درمانی دچار ناباروری شده‌اند، ارزشمند باشد. خواص آنتی‌اکسیدانی این عصاره گیاهی

منابع

- Solomon R, Shvartsur R, Azab AN. The Association Between Psychotropic Drug Use and Fertility Problems Among Male Subjects. *J Psychiatr Pract* 2019; 25(1):22-33.
- Liu FJ, Dong WY, Zhao H, Shi XH, Zhang YL. Effect of molybdenum on reproductive function of male mice treated with busulfan. *Theriogenology* 2019; 126:49-54.
- Ganjalkhan Hakemi S, Sharififar F, Haghpanah T, Babaee A, Eftekhari-Vaghefi SH. The Effects of Olive Leaf Extract on The Testis, Sperm Quality and Testicular Germ Cell Apoptosis in Male Rats Exposed to Busulfan. *Int J Fertil Steril* 2019; 13(1):57-65.
- Abofoul-Azab M, Lunenfeld E, Levitas E, et al. Identification of Premeiotic, Meiotic, and Postmeiotic Cells in Testicular Biopsies Without Sperm from Sertoli Cell-Only Syndrome Patients. *Int J Mol Sci* 2019; 20(3):470.
- Dehghani F, Sotoude N, Bordbar H, Panjeshahin MR, Karbalay-Doust S. The use of platelet-rich plasma (PRP) to improve structural impairment of rat testis induced by busulfan. *Platelets* 2019; 30(4):513-520.
- Jalilvand N, Hosseini M, Beheshti F, Ebrahimzadeh-Bideskan A. Protective effect of PPAR γ agonist pioglitazone, on testicular tissue and sperm parameters in hypothyroid rats. *Toxin Reviews* 2019; 24:1-10.
- Honaramooz A, Behboodi E, Hausler CL, et al. Depletion of endogenous germ cells in male pigs and goats in preparation for germ cell transplantation. *J Androl* 2005; 26(6):698-705.
- Li B, He X, Zhuang M, et al. Melatonin Ameliorates Busulfan-Induced Spermatogonial Stem Cell Oxidative Apoptosis in Mouse Testes. *Antioxid Redox Signal* 2018; 28(5):385-400.
- Vafaei A, Mohammadi S, Fazel A, Soukhtanloo M, Pour AM, Beheshti F. Effects of carob (*Ceratonia siliqua*) on sperm quality, testicular structure, testosterone level and oxidative stress in busulfan-induced infertile mice. *Pharmaceutical Sciences* 2018; 24(2):104-111.
- Jalili C, Kamani M, Roshankhah S, Sadeghi H, Salahshoor MR. Effect of *Falcaria vulgaris* extracts on sperm parameters in diabetic rats. *Andrologia* 2018; 50(10):e13130.
- Salahshoor MR, Haghjoo M, Roshankhah S, Makalani F, Jalili C. Effect of Thymoquinone on Reproductive Parameter in Morphine-treated Male Mice. *Adv Biomed Res* 2018; 7:18.
- Salahshoor MR, Khazaei M, Jalili C, Keivan M. Crocin Improves Damage Induced by Nicotine on A Number of Reproductive Parameters in Male Mice. *Int J Fertil Steril* 2016; 10(1):71-78.
- Roshankhah Sh, Jalili C, Salahshoor MR. Protective effects of *Petroselinum crispum* on ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury in rats. *Physiol Pharmacol* 2019; 23(2):129-139.
- Roshankhah Sh, Jalili C, Salahshoor MR. The effects of *Petroselinum crispum* extract on milk production parameters in female rats. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences* 2019; 24(1):11-23.
- Kitayama M, Tisarum R, Theerawitaya C, Samphumphung T, Takagaki M, Kirdmanee C, et al. Regulation on anthocyanins, α -tocopherol and calcium in two water spinach (*Ipomoea aquatica*) cultivars by NaCl salt elicitor. *Scientia Horticulturae* 2019; 249:390-400.
- Bokolo B, Adikwu E. Ethanolic leaf extract of *Ipomoea aquatica* Forsk abrogates cisplatin-induced kidney damage in albino rats. *J Nephropharmacol* 2019; 8(1):58-67.
- Kurade MB, Xiong JQ, Govindwar SP, Roh HS, Saratale GD, Jeon BH, et al. Uptake and biodegradation of emerging contaminant sulfamethoxazole from aqueous phase using *Ipomoea aquatica*. *Chemosphere* 2019; 225:696-704.
- Dewanjee S, Dua TK, Khanra R, et al. Water Spinach, *Ipomoea aquatica* (Convolvulaceae), Ameliorates Lead Toxicity by Inhibiting Oxidative Stress and Apoptosis [published correction appears in *PLoS One*. 2015;10(11):e0143766]. *PLoS One* 2015; 10(10):e0139831. Published 2015 Oct 16.
- Malakar C, Choudhury PPN. Pharmacological potentiality and medicinal uses of *Ipomoea aquatica* Forsk: a review. *Asian J Pharm Clin Res* 2015; 8(2):60-3.

20. Umar K, Muhammad M, Sani N, Muhammad S, Umar M. Comparative Study of Antioxidant Activities of the Leaves and Stem of *Ipomoea aquatica* Forsk (Water Spinach). *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences* 2015; 23(1):81-4.
21. Ibrahim MH, Abas NA, Zahra SM. Impact of Salinity Stress on Germination of Water Spinach (*Ipomoea aquatica*). *Annual Research & Review in Biology* 2019; 1-12.
22. Qu N, Itoh M, Sakabe K. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis: The role of testicular immunology. *International journal of molecular sciences* 2019; 20(4):957.
23. Ghasemzadeh A, Nouri M, Sedghiani M, Yousefzadeh S, Fadaei Fouladi R. Effects of Pentoxifylline on In Vitro Sperm Motility and Viability of Infertile Males with Oligoasthenospermia. *Iran J Obstet Gynecol Infertil* 2013; 15(38):1-6.
24. Ahemen T, Abu AH, Orakaanya TT. Sperm quality and testicular morphometry of rabbits fed dietary levels of water spinach (*Ipomoea aquatica*) leaf meal. *Agriculture and biology journal of north America* 2013; 4(3):352-357.
25. Alkiyumi SS, Abdullah MA, Alrashdi AS, Salama SM, Abdelwahab SI, Hadi AH. *Ipomoea aquatica* extract shows protective action against thioacetamide-induced hepatotoxicity. *Molecules* 2012; 17(5):6146-6155. Published 2012 May 22.
26. Selvakumar E, Prahalthan C, Mythili Y, Varalakshmi P. Protective effect of DL-alpha-lipoic acid in cyclophosphamide induced oxidative injury in rat testis. *Reprod Toxicol* 2004; 19(2):163-167.
27. Potnuri AG, Allakonda L, Lahkar M. Crocin attenuates cyclophosphamide induced testicular toxicity by preserving glutathione redox system. *Biomed Pharmacother* 2018 ;101:174-180.
28. Olejnik J, Suchowerska N, Herrid M, Jackson M, Hinch G, Hill J. Spermatogonia survival in young ram lambs following irradiation, Busulfan or thermal treatment. *Small ruminant research* 2018; 166:22-7.
29. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 250(1-2):66-69.
30. Moloody M, Shahrooz R, Razi M, Zarei L, Mohammadi V. The Effect of CoQ10 on Testicular Tissue in Rats Treating with Busulfan: Sperm Quality and Histological Changes. *Iranian Journal of Veterinary Surgery* 2018; 13(1):29-38.
31. Bahmanpour S, Namavar Jahromi B, Koohpeyma F, Keshavarz M, Bakhtari A. Effects of Different Doses and Time-Dependency of Busulfan on Testes Parameters and Spermatogenesis in a Rat Model: A Quantitative Stereological Study. *Journal of Advanced Medical Sciences and Applied Technologies* 2017; 3(3):155-62.
32. Bar-Shira Maymon B, Yogev L, Marks A, Hauser R, Botchan A, Yavetz H. Sertoli cell inactivation by cytotoxic damage to the human testis after cancer chemotherapy. *Fertil Steril* 2004; 81(5):1391-1394.
33. Saenphet K, Saenphet S, Intamong J, Nakas T, Buncharoen W. Acute toxicity and histopathological changes in livers of frog tadpoles (*Hoplobatrachus rugulosus*) exposed to bioinsecticides derived from *Azadirachta indica* A. Juss., *Stemona curtisii* Hook. F., and *Mammea siamensis*. *Comparative Clinical Pathology* 2018; 27(4):939-46.
34. Zheng Y, Hu G, Wu W, et al. Reshaping fecal gut microbiota composition by growing with *Polygonum cuspidatum*, *Houttuynia cordata*, and *Ipomoea aquatica*. *Can J Microbiol* 2019; 65(7):522-529.
35. Abu A, Ameh M, Iheukwumere F. Semen quality of Nigerian local cocks treated with human menopausal gonadotropin (Pergonal®). *Livestock Research for Rural Development* 2006; 18(3):44.
36. Zhao Y, Zhang S. PGAM1 knockdown is associated with busulfan-induced hypospermatogenesis and spermatogenic cell apoptosis. *Mol Med Rep* 2019; 19(4):2497-2502.
37. Vahdati A, Fathi AR, Nasimi P, Saki G. Busulfan induces apoptotic and cytotoxic effects on testis and epididymal sperm of adult male mouse following low dose treatment. *Int J Bio* 2015; 5:70-78.
38. Guvvala PR, Sellappan S, Parameswaraiyah RJ. Impact of arsenic(V) on testicular oxidative stress and sperm functional attributes in Swiss albino mice. *Environ Sci Pollut Res Int* 2016; 23(18):18200-18210.

