

## اثر حفاظتی عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب (سراتونیا سیلیکوا) بر بافت بیضه در موش‌های صحرایی بالغ تیمار شده با دوکسوروبیسین

تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۵/۶؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۴/۱۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** دوکسوروبیسین یکی از پرمصرف‌ترین داروهای ضد سرطان بشمار می‌رود. هدف از این مطالعه بررسی اثر حفاظتی عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب بر بافت بیضه در موش‌های صحرایی بالغ تیمار شده با دوکسوروبیسین است. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی از ۵۶ موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار در ۷ گروه ۸ تایی استفاده شد. گروه کنترل فقط آب و مواد غذایی معمولی دریافت کردند. گروه شم آب مقطر به میزان ۳ mg/kg به روش تزریق درون صفاقی دریافت کردند. گروه شاهد ۱ فقط داروی دوکسوروبیسین دوز ۳ mg/kg یکبار در هفته به مدت ۴ هفته به روش تزریق درون صفاقی دریافت کردند. گروه ۲ شاهد ۲ میزان حداکثر دوز (۶۰۰ mg/kg) از عصاره هیدرو الکلی خرنوب به مدت ۴۸ روز به صورت گاواژ دریافت کرد و گروه‌های تجربی ۱، ۲ و ۳ داروی دوکسوروبیسین به میزان ۳ mg/kg یکبار در هفته به مدت ۴ هفته به صورت تزریق درون صفاقی و به ترتیب ۶۰۰، ۳۰۰ و ۱۵۰ mg/kg عصاره هیدرو الکلی خرنوب را به مدت ۴۸ روز به صورت گاواژ دریافت کردند. جهت بررسی بافت بیضه از روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین استفاده شد.

**نتایج:** میانگین وزن بدن، تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت، تعداد سلول‌های اسپرماتید و تعداد سلول‌های لایدیگ در گروه تجربی دریافت‌کننده دوکسوروبیسین و دوز ۳۰۰ mg/kg عصاره هیدرو الکلی خرنوب در مقایسه با گروه دریافت‌کننده دوکسوروبیسین افزایش معنی‌دار نشان داد. در گروه‌های تجربی دریافت‌کننده دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوزهای ۶۰۰ و ۱۵۰ mg/kg میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و لایدیگ کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه‌های کنترل و شم نشان دادند ( $P < 0.05$ ). همچنین مطالعات بافت‌شناسی نشان داد که میزان چروکیدگی بافت بیضه در گروه تجربی دریافت‌کننده دوکسوروبیسین و دوز ۳۰۰ mg/kg عصاره هیدرو الکلی خرنوب در مقایسه با گروه دریافت‌کننده دوکسوروبیسین کاهش بیشتری مشاهده گردیده است که نشانگر تأثیر این دوز در بازسازی بافت بیضه است.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که عصاره هیدرو الکلی خرنوب در دوز ۳۰۰ mg/kg دارای اثر حفاظتی بر مسمومیت اسپرماتوزنز القا شده توسط داروی دوکسوروبیسین می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** خرنوب، دوکسوروبیسین، بیضه، موش صحرایی

هنگامه مهدی خانی<sup>۱</sup>، مهرداد شریعتی<sup>۲</sup>، محسن فروزانفر<sup>۳</sup>، سید ابراهیم حسینی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری زیست‌شناسی تکوینی، گروه بیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه بیولوژی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

<sup>۳</sup> استادیار، گروه بیولوژی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

<sup>۴</sup> دانشیار، گروه بیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

نویسنده مسئول:

دانشیار، گروه بیولوژی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

۰۹۱۷۳۱۳۳۲۲۱

E-mail: mehrdadshariati@hotmail.com

## مقدمه

در مطالعه الزوبی و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان داده شد که گیاه خرنوب از نقص حافظه‌ای کوتاه‌مدت القا شده توسط استرس مزمن در موش صحرایی جلوگیری می‌کند.<sup>۱</sup>

میوه خرنوب سطح گلوکز و کلسترول سرم را کاهش می‌دهد.<sup>۲</sup> در مطالعه قاسم و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان داده شد که دوزهای بالای خرنوب دارای فعالیت ضد افزایش قند خون بر مدل موش صحرایی دیابتی القا شده توسط استروپتوزوتوسین-نیکوتین امید می‌باشد.<sup>۳</sup>

در مطالعه ال-الایان و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان داده شد که عصاره غلاف گیاه خرنوب استرس اکسیداتیو و فیروز کبیدی القاشده توسط شیستوزوما مانسونی را تصحیح می‌کند.<sup>۴</sup> همچنین در مطالعه رطیبی و همکاران در سال ۲۰۱۵ مشخص گردید که خرنوب بازجذب روده‌ای گلوکز را مهار می‌کند و تحمل گلوکز را بهبود می‌بخشد. خرنوب موش‌های صحرایی را علیه دیابت‌های القاشده توسط آلوکسان محافظت می‌کند.<sup>۵</sup>

علاوه بر این در مطالعه لاکاب و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان داده شد که استفاده از خرنوب دارای اثرات غیرقابل انکاری در درمان بیماریهای مخرب عصبی است.<sup>۶</sup> در مطالعه رطیبی و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داده شد که عصاره خرنوب دارای اثرات حفاظتی گوارشی قوی بر علیه استرس اکسیداتیو القاشده توسط اتانول در موش‌های صحرایی می‌باشد که بخشی از آن به خواص آنتی‌اکسیدانتی آن مربوط می‌باشد.<sup>۷</sup>

همچنین در مطالعه سویل و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داده شد که عصاره آبی خرنوب می‌تواند دارای اثرات محافظتی کبیدی مفیدی بر علیه استرس اکسیداتیو القا شده توسط اتانول حاد در موش‌های صحرایی می‌باشد.<sup>۸</sup> علاوه بر این در مطالعه آگراوال و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داده شد که عصاره میوه خرنوب دارای فعالیت ضد افسردگی واسطه شده بوسیله نورآدرنالین و دوپامین می‌باشد.<sup>۹</sup>

در مطالعه آتا و همکاران در سال ۲۰۱۸ مشخص گردید که عصاره میوه خرنوب می‌تواند اثرات مفیدی بر غلظت اسپرم در خرگوشها داشته باشد.<sup>۱۰</sup> در مطالعه مهدی‌خانی و همکاران در سال ۲۰۱۸ مشخص گردید که در گروه‌های دریافت‌کننده خرنوب

عوامل مختلفی بر تولید اسپرم تأثیر گذاشته و منجر به بروز ناباروری می‌شوند. این عوامل در حال حاضر داروهای ضد سرطان، آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد سمی و آفت‌کش‌ها، تابش، استرس، کمبود ویتامین و آلودگی هوا می‌باشند که می‌توانند تعداد اسپرم را توسط القای رادیکال‌های آزاد و اکسیداسیون اپی‌تلیوم ژرمنال در بافت بیضه کاهش دهند.<sup>۱</sup>

دوکسوریسین دارویی آنتراسیکلیک است که بیشتر برای تومورهای جامد تجویز می‌شود و دارای اثرات زیان‌بار بر باروری است.<sup>۲</sup> دوکسوریسین تا حد زیادی در درمان سرطان در کودکان استفاده می‌شود و برای سلول‌ها بسیار تهاجمی است. دوکسوریسین در موش نابالغ باعث صدمه به اسپرماتوگونی و خسارات غیرقابل برگشتی به اسپرماتوژنز در بزرگسالان می‌گردد. دوکسوریسین منجر به آسیب‌هایی گسترده مانند کاهش اسپرماتوگونی، ماکولا و یا در اوایل مرحله اسپرمیوژنز در اسپرماتیدها، در اپیتلیوم زاینده، اپیدیدیم، کاهش تعداد اسپرم و کاهش تحرک اسپرم می‌گردد.<sup>۳</sup>

خرنوب بانام علمی *Ceratonia siliqua* گیاهی متعلق به خانواده *Fabaceae* است. خرنوب بومی مناطق مدیترانه می‌باشد و در جنوب سوریه، هند و در بسیاری از مناطق شرق مدیترانه همچنین در کالیفرنیا یافت می‌شود و در منطقه شاپور کازرون در استان فارس در ایران نیز رشد می‌کند.<sup>۴</sup>

غلاف خرنوب یک منبع از کربوهیدرات‌های غیر سازه‌ای است (حدود ۴۵٪) و این قند بیشتر از ساکارز تشکیل شده است. به همین دلیل غنی از انرژی و همچنین بسیار خوش طعم است. غلاف خرنوب حاوی لگنین<sup>۵</sup>، منبع کمی از پروتئین (حدود ۵٪)، مقادیر کم چربی و لیزین و غنی از اسیدهای چرب لینولئیک و اولئیک است.<sup>۶</sup> از برگ‌ها و غلاف خرنوب گالیک اسید و ترکیبات فنولی جدا شده‌اند.<sup>۷</sup> از عصاره خرنوب برخی ترکیبات از جمله لوپئول، جنیستین و لیکوریتجین جدا شده است.<sup>۸</sup> سلول‌های بنیادی دانه خرنوب حاوی اسیدهای چرب از جمله میرستیک اسید، پالمیتیک اسید، اولئیک اسید، لینولئیک اسید، آراشیدونیک اسید و گالدوئیک اسید است.<sup>۹</sup>

### تیمار حیوانات

حیوانات به ۷ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل فقط آب و مواد غذایی معمولی دریافت کردند. گروه شم آب مقطر به میزان ۳ mg/kg به روش تزریقی درون صفاقی دریافت کردند. گروه شاهد ۱ که فقط داروی دوکسوروبیسین (DOX) را با دوز ۳ mg/kg یکبار در هفته به مدت ۴ هفته به روش درون صفاقی دریافت کردند. گروه شاهد ۲ میزان حداکثر دوز (۶۰۰ mg/kg) عصاره هیدرو الکلی خرنوب به مدت ۴۸ روز به صورت گاوژ دریافت کرد. گروه تجربی ۱ داروی دوکسوروبیسین به میزان ۳ mg/kg یکبار در هفته به مدت ۴ هفته به صورت درون صفاقی و (۱۵۰ mg/kg) عصاره هیدرو الکلی خرنوب را به مدت ۴۸ روز به صورت گاوژ دریافت کردند. گروه تجربی ۲ داروی دوکسوروبیسین به میزان ۳ mg/kg یکبار در هفته به مدت ۴ هفته به صورت درون صفاقی و (۳۰۰ mg/kg) عصاره هیدرو الکلی خرنوب را به مدت ۴۸ روز به صورت گاوژ دریافت کردند. گروه تجربی ۳ داروی دوکسوروبیسین به میزان ۳ mg/kg یکبار در هفته به مدت ۴ هفته به صورت درون صفاقی و (۶۰۰ mg/kg) عصاره هیدرو الکلی خرنوب را به مدت ۴۸ روز به صورت گاوژ دریافت کردند. شروع تجویز عصاره خرنوب و داروی دوکسوروبیسین در تمام گروه‌های مورد آزمایش بطور همزمان بود. انتخاب دوزهای تزریقی عصاره خرنوب<sup>۲۱</sup> و مدت زمان تجویز<sup>۲۲</sup> و دوز داروی دوکسوروبیسین (DOX)<sup>۲۳</sup> با استفاده از مطالعات قبلی صورت گرفت.

### مطالعات بافتی بیضه

پس از پایان یافتن دوره تیمار حیوانات تحت تأثیر بیهوشی با کتامین و زایلازین قرار گرفتند. پس از کالبدگشایی حیوانات بیضه‌های چپ و راست آنها برداشته شد. در مرحله تثبیت بافتها در فرمالین بافرخنی<sup>۱۰</sup> درصد تثبیت گردیدند. مرحله آگیری به کمک الکل با غلظت‌های متفاوت (از کم به زیاد) صورت گرفت. مرحله شفاف سازی با قرار دادن بافت‌ها در دو ظرف حاوی زایلین صورت گرفت. در مرحله جایگزینی بافتها در سه ظرف حاوی پارافین مذاب (۶۵ درجه سانتی گراد) هر کدام یک ساعت قرار داده شدند. در مرحله قالب گیری از قطعات سالو کهارت استفاده شد.

غلظت و تحرک اسپرم افزایش و استرس اکسیداتیو و عوامل التهابی کاهش پیدا کرد<sup>۱۸</sup>.

با توجه به خواص آنتی اکسیدانی گیاه خرنوب در این تحقیق به بررسی اثر حفاظتی عصاره هیدرو الکلی میوه و غلاف خرنوب بر تغییرات بافتی بیضه موش‌های صحرایی تحت تیمار با دوکسوروبیسین (داروی شیمی درمانی) پرداخته شده است تا در صورت موثر بودن به عنوان مکمل غذایی - دارویی برای کاهش عوارض جانبی ناشی از داروهای شیمی درمانی از جمله دوکسوروبیسین بر اسپرماتوزن در مردان مورد استفاده قرار گیرد.

### مواد و روش‌ها

#### آماده‌سازی و استخراج عصاره هیدرو الکلی خرنوب

میوه خرنوب از ترکیه تهیه شد. ابتدا میوه گیاه خشک خرنوب را به صورت پودر در آورده و بعد ۱۰۰ گرم از پودر مورد نظر را با ۵۰۰ سی سی اتانول ۷۰ درصد به مدت ۷۲ ساعت در دستگاه پرکولاتور ریخته و پس از گذشت زمان مورد نظر محلول حاوی عصاره از تفاله‌های آن جدا شد. سپس محلول را در دستگاه روتاری قرار داده تا حلال از آن جدا شود. در این حالت محلول عسلی مانند ایجاد شد که آن را در یک دسیکاتور متصل به پمپ خلا قرار داده تا کاملاً خشک شود. سپس دوزهای مورد نظر عصاره را با حل کردن همان مقدار گرم پودر خشک گیاه خرنوب (۶۰۰ و ۳۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم) در یک سی سی نرمال سالین تهیه گردید و با توجه به وزن حیوان تجویز انجام شد<sup>۱۹،۲۰</sup>.

### حیوانات

در این مطالعه تجربی از ۵۶ سر موش صحرایی بالغ نر نژاد ویستار ۲/۵ تا ۳ ماهه با وزن تقریبی  $210 \pm 10$  گرم استفاده شد. حیوانات بطور تصادفی در ۷ گروه ۸ تایی تا زمان انجام آزمایش در قفسهای استاندارد و تحت شرایط یکسان با دمای ۲۰-۲۲ درجه سانتیگراد و با چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگه داری شدند. آب و غذای کافی در اختیار آنها قرار گرفت و ملاحظات اخلاقی در مورد حیوانات رعایت شد.

گروه تجربی ۲ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg در سطح (P=0.009) افزایش معنی‌داری نشان داد. میانگین وزن بدن در گروه شاهد ۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg نسبت به گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg افزایش معنی‌داری نشان داد (P<0.05). میانگین وزن بدن در گروه‌های تجربی ۳ و ۲ و ۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به یکدیگر تغییر معنی‌داری نشان نداد (نمودار ۱).

میانگین تعداد سلول‌های سرتولی گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg نسبت به گروه کنترل و شم کاهش معنی‌داری را نشان داد (P<0.05). میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در تمام گروه‌های تجربی دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب و شاهد ۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg نسبت به گروه کنترل و شم تغییر معنی‌داری نشان نداد. میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در تمام گروه‌های تجربی دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg تغییر معنی‌داری نشان نداد. میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در گروه‌های تجربی ۳ و ۲ و ۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به یکدیگر تغییر معنی‌داری نشان نداد (نمودار ۲).

میانگین تعداد سلول‌های لایدیگ در گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg نسبت به گروه کنترل و شم کاهش معنی‌داری را نشان داد (P<0.001). میانگین تعداد سلول‌های لایدیگ در گروه‌های تجربی ۳ و ۲ و ۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه کنترل و شم کاهش معنی‌داری نشان داد (P<0.001). میانگین تعداد سلول‌های لایدیگ در گروه تجربی ۲ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب و شاهد ۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg نسبت به گروه کنترل و شم تغییر معنی‌داری نشان نداد (P<0.05). میانگین تعداد

در مرحله مقطع گیری مقاطع بافتی به ضخامت ۴-۵ میکرون بریده شد و در مرحله رنگ‌آمیزی از رنگ هماتوکسیلین-ائوزین استفاده گردید. تمام مطالعات بافتی زیر نظر پاتولوژیست صورت گرفت.

به منظور شمارش سلولها از هر گروه ۴۰ مقطع عرضی لوله اسپرم ساز مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت. از هر اسلاید حداقل ۵ لوله اسپرم ساز انتخاب و پس از شناسایی سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید، سلول‌های سرتولی و لایدیگ شمارش و میانگین گرفته شد و نتایج آماری مورد بررسی قرار گرفت.

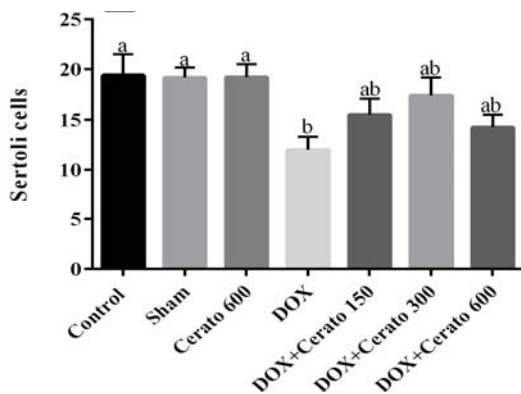
## آنالیز آماری

مقادیر بدست آمده از پارامترهای بافتی در گروه‌های کنترل، شم، شاهد ۱ و ۲ و گروه‌های تجربی (گروه‌های دریافت‌کننده دوز ۱۵۰ mg/kg، ۳۰۰ و ۶۰۰ عصاره هیدرو الکلی خرنوب) با نرم افزار SPSS وژن ۲۲ و از طریق آزمون ANOVA و تست توکی به طور جداگانه آنالیز و با یکدیگر مقایسه شدند و سطح (P<0.05) مرز استنتاج آماری در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای انحراف معیار ارائه شد.

## نتایج

میانگین وزن بدن در گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg نسبت به گروه کنترل و شم کاهش معنی‌داری را نشان داد (P<0.001) و (P<0.05). میانگین وزن بدن در گروه‌های تجربی ۳ و ۲ و ۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه کنترل و شم کاهش معنی‌داری نشان داد (P<0.001) و (P<0.01). میانگین وزن بدن در گروه تجربی ۲ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب و شاهد ۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg نسبت به گروه کنترل و شم تغییر معنی‌داری نشان نداد (P<0.05). میانگین وزن بدن در گروه‌های تجربی ۳ و ۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg تغییر معنی‌داری نشان نداد. میانگین وزن بدن در





نمودار ۲: مقایسه میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در گروه‌های مورد آزمایش

گروه شاهد ۲: دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg (cerato 600). گروه تجربی ۱: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۱۵۰ mg/kg (DOX+ cerato 150). گروه تجربی ۲: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۳۰۰ mg/kg (DOX+ cerato 300). گروه تجربی ۳: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg (DOX+ cerato 600).

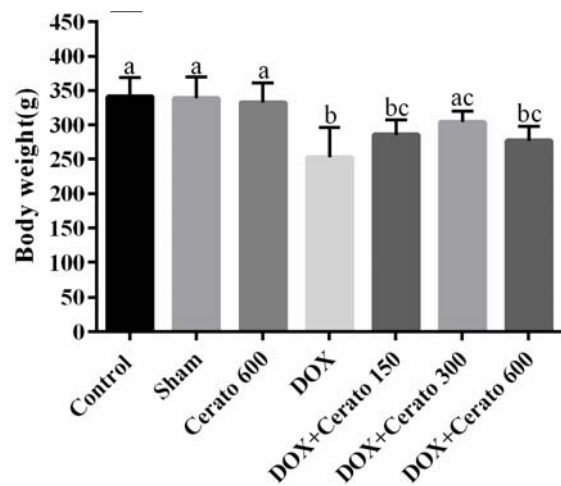
مقادیر برحسب میانگین  $\pm$  خطای انحراف معیار ارائه شد. در نمودار وجود حداقل یک حرف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مورد بررسی می‌باشد. اگر حرف مشابهی بین گروه‌ها وجود نداشته باشد نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $(p < 0.05)$  می‌باشد.

گروه کنترل: (Control). گروه شام (Sham). گروه شاهد ۱: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg (DOX). گروه شاهد ۲: دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg (cerato 600). گروه تجربی ۱: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۱۵۰ mg/kg (DOX+ cerato 150). گروه تجربی ۲: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۳۰۰ mg/kg (DOX+ cerato 300). گروه تجربی ۳: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg (DOX+ cerato 600).

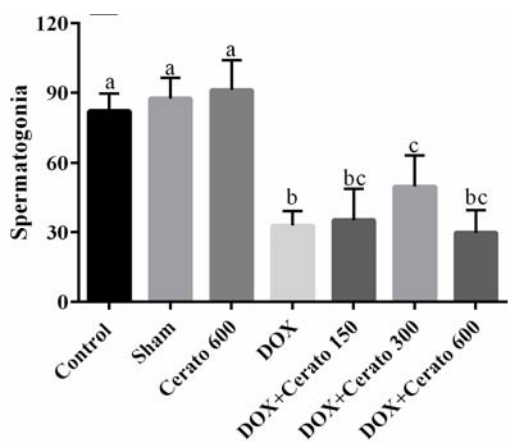
تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروه شاهد ۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg نسبت به گروه کنترل و شم تغییر معنی‌داری نشان نداد. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروه‌های تجربی ۱ و ۲ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg به ترتیب در سطح  $(P=0.006)$  و  $(P=0.001)$  افزایش معنی‌داری نشان داد. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروه شاهد ۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg نسبت به گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg افزایش معنی‌داری نشان داد  $(P < 0.05)$ . میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروه‌های تجربی ۱ و ۲ و ۳ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب نسبت به یکدیگر تغییر معنی‌داری نشان نداد (نمودار ۶).

مقادیر برحسب میانگین  $\pm$  خطای انحراف معیار ارائه شد. در نمودار وجود حداقل یک حرف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مورد بررسی می‌باشد. اگر حرف مشابهی بین گروه‌ها وجود نداشته باشد نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $(p < 0.05)$  می‌باشد.

گروه کنترل: (Control). گروه شام (Sham). گروه شاهد ۱: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg (DOX).

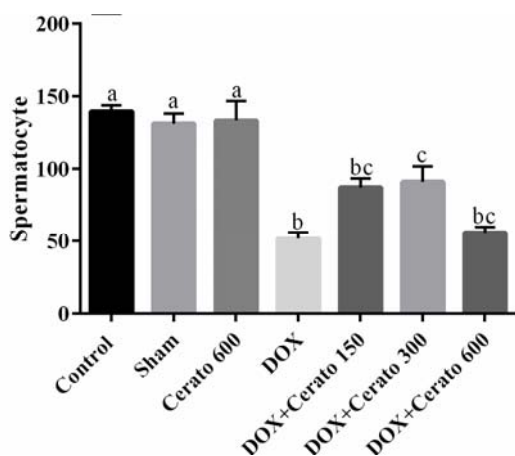


نمودار ۱: مقایسه میانگین وزن بدن در گروه‌های مورد آزمایش

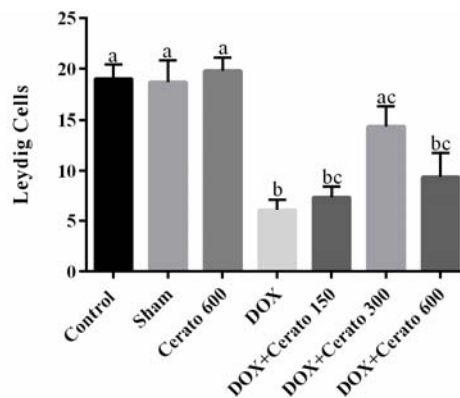


نمودار ۴: مقایسه میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه‌های مورد آزمایش

گروه شاهد ۲: دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg (cerato 600). گروه تجربی ۱: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۱۵۰ mg/kg (DOX+ cerato 150). گروه تجربی ۲: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۳۰۰ mg/kg (DOX+ cerato 300). گروه تجربی ۳: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg (DOX+ cerato 600).



نمودار ۵: مقایسه میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در گروه‌های مورد آزمایش



نمودار ۳: مقایسه میانگین تعداد سلول‌های لایدیگ در گروه‌های مورد آزمایش

مقادیر برحسب میانگین  $\pm$  خطای انحراف معیار ارائه شد. در نمودار وجود حداقل یک حرف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مورد بررسی می‌باشد. اگر حرف مشابهی بین گروه‌ها وجود نداشته باشد نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $(p < 0.05)$  می‌باشد.

گروه کنترل: (Control). گروه شم (Sham). گروه شاهد ۱: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg (DOX). گروه شاهد ۲: دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg (cerato 600). گروه تجربی ۱: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۱۵۰ mg/kg (DOX+ cerato 150). گروه تجربی ۲: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۳۰۰ mg/kg (DOX+ cerato 300). گروه تجربی ۳: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg (DOX+ cerato 600).

مقادیر برحسب میانگین  $\pm$  خطای انحراف معیار ارائه شد. در نمودار وجود حداقل یک حرف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مورد بررسی می‌باشد. اگر حرف مشابهی بین گروه‌ها وجود نداشته باشد نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $(p < 0.05)$  می‌باشد.

گروه کنترل: (Control). گروه شم (Sham). گروه شاهد ۱: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg (DOX).

گروه کنترل: (Control). گروه شام (Sham). گروه شاهد ۱: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg (DOX). گروه شاهد ۲: دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg (cerato 600). گروه تجربی ۱: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۱۵۰ mg/kg (DOX+ cerato 150). گروه تجربی ۲: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۳۰۰ mg/kg (DOX+ cerato 300). گروه تجربی ۳: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg (DOX+ cerato 600).

### یافته‌های بافت‌شناسی بیضه

بررسی‌های بافت‌شناسی نشان داد که در گروه‌های کنترل و شام سلول‌های زاینده طبیعی و هیچ‌گونه تغییر پاتولوژیکی مشاهده نشد و لوله‌های اسپرم ساز از لحاظ ظاهری کاملاً سالم بودند و تمام رده‌های سلولی اسپرماتوزنز وجود داشتند (اشکال A, C).

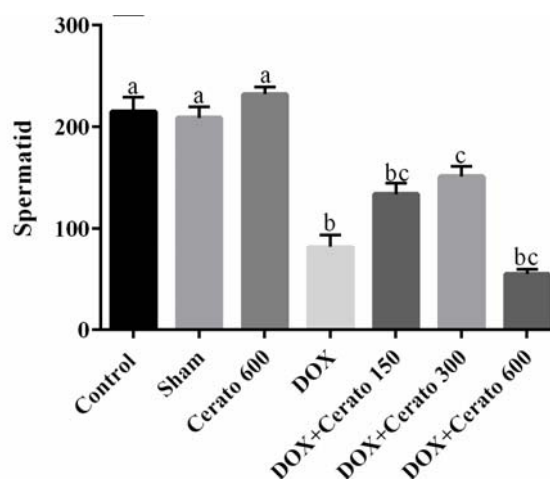
در گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg چروکیده شدن توبول‌ها، از هم گسیختگی ژرمینال اپیتلیوم، ضخیم شدن غشای پایه توبول‌های اسپرم ساز، واکوتله شدن فضای درون توبول‌ها و وجود نقاط خالی داخل توبول‌ها نشان دهنده اثرات مخرب دوکسوروبیسین بر بافت بیضه می‌باشد. در گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg کاهش تمام رده‌های سلولی اسپرماتوزنز نسبت به گروه کنترل و شام مشاهده شد (شکل G).

در گروه شاهد ۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg همانند گروه کنترل و شام توبول‌ها و سلول‌های زاینده طبیعی و مملو از سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید، اسپرماتوزوئید و لایدیگ می‌باشند، همچنین هیچ‌گونه تغییر پاتولوژیکی در بافت بیضه این گروه نسبت به گروه کنترل و شام مشاهده نگردید. در گروه شاهد ۲ افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید، اسپرماتوزوئید و لایدیگ نسبت به گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین مشاهده گردید (شکل E).

مقادیر برحسب میانگین  $\pm$  خطای انحراف معیار ارائه شد. در نمودار وجود حداقل یک حرف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مورد بررسی می‌باشد. اگر حرف مشابهی بین گروه‌ها وجود نداشته باشد نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $(p < 0.05)$  می‌باشد.

گروه کنترل: (Control). گروه شام (Sham). گروه شاهد ۱: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز ۳ mg/kg (DOX). گروه شاهد ۲: دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg (cerato 600). گروه تجربی ۱: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۱۵۰ mg/kg (DOX+ cerato 150). گروه تجربی ۲: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۳۰۰ mg/kg (DOX+ cerato 300). گروه تجربی ۳: دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg (DOX+ cerato 600).

مقادیر برحسب میانگین  $\pm$  خطای انحراف معیار ارائه شد. در نمودار وجود حداقل یک حرف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مورد بررسی می‌باشد. اگر حرف مشابهی بین گروه‌ها وجود نداشته باشد نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح  $(p < 0.05)$  می‌باشد.



نمودار ۶: مقایسه میانگین میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروه‌های مورد آزمایش

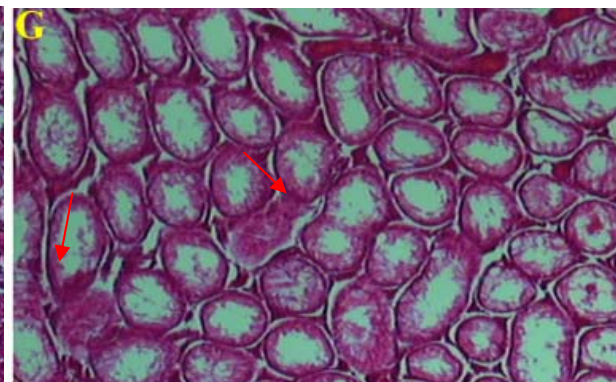
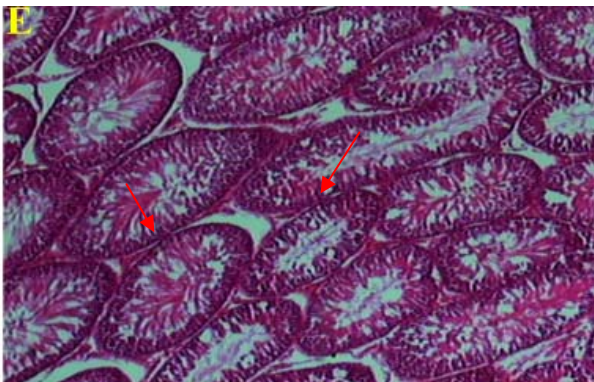
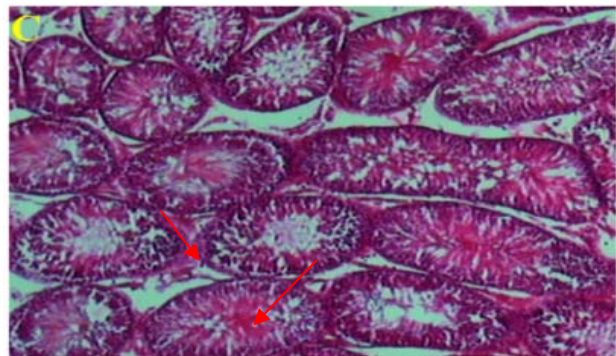
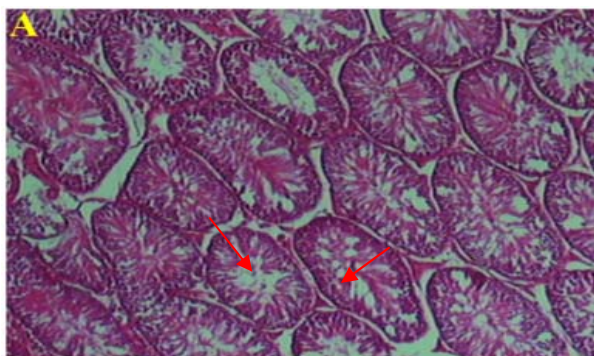


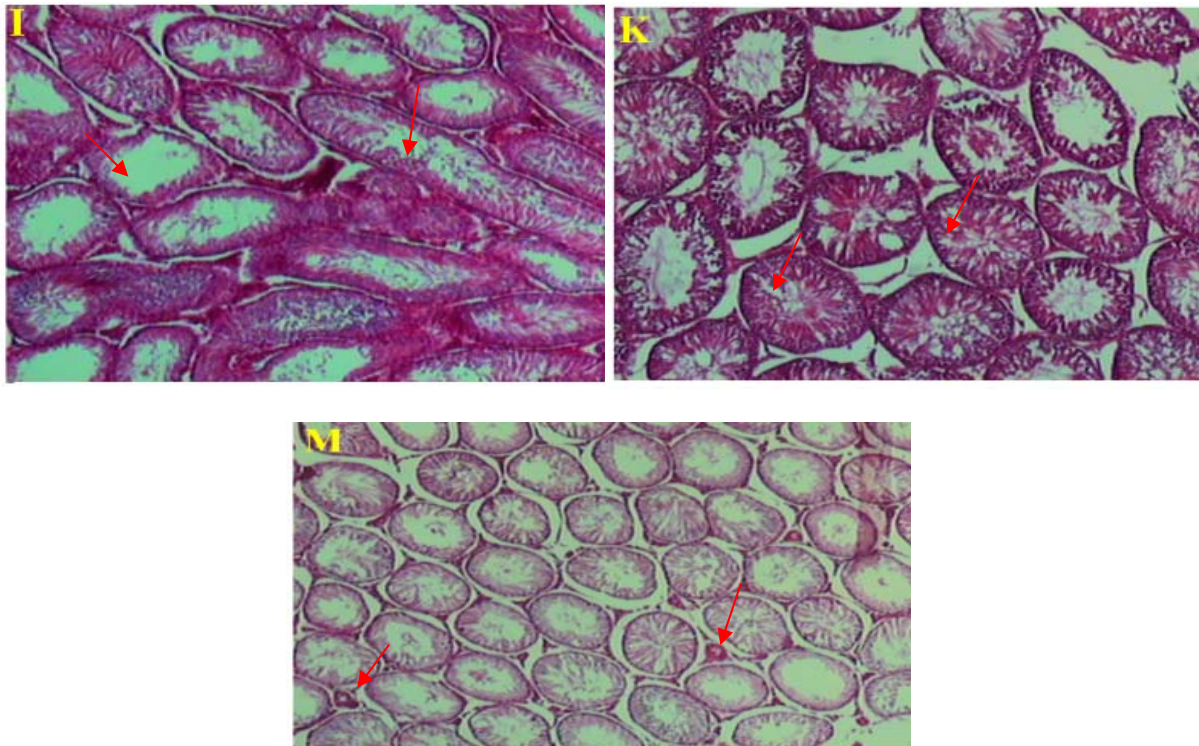
دوکسوروبیسین مشاهده شد. در گروه تجربی ۲ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدروالکلی خرنوب با دوز ۳۰۰ mg/kg کاهش قابل توجهی در میزان چروگیدکی بافت بیضه و تعداد سلول های اسپرماتوژونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید، اسپرماتوزوئید و لایدیگ در مقایسه با گروههای تجربی دریافت‌کننده دوزهای دیگر عصاره مشاهده شد که نشانگر تأثیر این دوز در بازسازی بافت بیضه می‌باشد (شکل K).

در گروه تجربی ۳ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدروالکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg، کاهش معنی‌داری در تعداد سلول های اسپرماتوژونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید، اسپرماتوزوئید و لایدیگ نسبت به گروه کنترل و شم مشاهده شد. در گروه تجربی ۳ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدروالکلی گیاه خرنوب با دوز ۶۰۰ mg/kg، تغییر معنی‌داری در تعداد سلول های اسپرماتوژونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید، اسپرماتوزوئید و لایدیگ نسبت به گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین مشاهده نشد (شکل M).

در گروه تجربی ۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدروالکلی گیاه خرنوب با دوز ۱۵۰ mg/kg، کاهش معنی‌داری در تعداد سلول های اسپرماتوژونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید، اسپرماتوزوئید و لایدیگ نسبت به گروه کنترل و شم مشاهده شد. در گروه تجربی ۱ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدروالکلی گیاه خرنوب با دوز ۱۵۰ mg/kg، تغییر معنی‌داری در تعداد سلول های اسپرماتوژونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید، اسپرماتوزوئید و لایدیگ نسبت به گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین مشاهده نشد (شکل I).

در گروه تجربی ۲ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدروالکلی خرنوب با دوز ۳۰۰ mg/kg، تغییر معنی‌داری در تعداد سلول های اسپرماتوژونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید، اسپرماتوزوئید و لایدیگ نسبت به گروه کنترل و شم مشاهده نشد. در گروه تجربی ۲ دریافت‌کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدروالکلی گیاه خرنوب با دوز ۳۰۰ mg/kg، افزایش معنی‌داری در تعداد سلول های اسپرماتوژونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید، اسپرماتوزوئید و لایدیگ نسبت به گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده





**شکل ۱:** فتومیکروگراف از برش عرضی بافت بیضه در گروه‌های مختلف. (رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی  $40 \times$ ). A: گروه کنترل (آرایش منظم سلولها مشاهده می‌شود). C: گروه کنترل شم (آرایش منظم سلولها مشاهده می‌شود). G: گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین با دوز  $3 \text{ mg/kg}$  (کاهش تعداد سلول‌های زاینده نسبت به گروه‌های شم و کنترل). E: گروه شاهد ۲ دریافت‌کننده عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز  $3 \text{ mg/kg}$  (افزایش تعداد سلول‌های زاینده نسبت به گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین). I: گروه تجربی ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز  $150 \text{ mg/kg}$  (عدم تغییر تعداد سلول‌های زاینده نسبت به گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین). K: گروه تجربی ۲ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز  $300 \text{ mg/kg}$  (افزایش تعداد سلول‌های زاینده نسبت به گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین). M: گروه تجربی ۳ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین + عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز  $600 \text{ mg/kg}$  (عدم تغییر تعداد سلول‌های زاینده نسبت به گروه شاهد ۱ دریافت‌کننده دوکسوروبیسین).

شناسی و عملکردی به سلول‌های سرتولی می‌گردد<sup>۲۴</sup>.

دوکسوروبیسین مرگ سلولی را در آستر سلولی سلول‌های بنیادی در بیضه موش‌های نابالغ القا می‌کند<sup>۲۵</sup>. در تحقیق دیگری اثبات گردید که بعد از ۲۱ و ۲۸ روز از درمان موش‌های صحرایی با دوکسوروبیسین با دوز  $7/5 \text{ mg/kg}$  کاهش قابل ملاحظه سلول‌های زاینده بیضه ملاحظه گردید و همچنین در دوره مطالعه کاهش ارتفاع لوله‌های منی ساز، قطر لوله‌های منی ساز و بخش‌های لوله‌های منی ساز و همچنین افزایش بخش‌های درون لوله ای

## بحث

در مطالعه حاضر میانگین وزن بدن، تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید، میانگین سلول‌های سرتولی و لایدیگ در گروه شاهد دریافت‌کننده دوکسوروبیسین  $3 \text{ mg/kg}$  (DOX) نسبت به گروه کنترل و شم کاهش معنی‌داری نشان داد. به نظر می‌رسد که نتایج این تحقیق با مطالعات گذشته همخوانی دارد. در یک مطالعه مشخص گردید که القای دوکسوروبیسین در دوره قبل از بلوغ در موش‌های صحرایی منجر به آسیب ریخت

مشاهده گردید.<sup>۲۶</sup>

سرب بطور معنی داری پارامترهای اسپرم، محتوی گلو تاتیون، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانسی را بهبود می بخشد و باعث تنظیم کاهشی بیان بیضه ای ژن های i NOS, Nrf2 در مقایسه با گروه دریافت کننده سرب می گردد.<sup>۲۲</sup>

در مطالعه وفایی و همکاران در سال ۲۰۱۸ مشخص گردید که القای ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره خرنوب به مدت ۳۵ روز کیفیت اسپرم، پارامترهای بیوشیمیایی، ضخامت اپیتلیوم زاینده و سطح تستوسترون را در موش های نابارور القا شده توسط بوسولفان بهبود می بخشد. در گروه های دریافت کننده عصاره خرنوب سطح مالون الدهید در مقایسه با گروه بوسولفان کاهش معنی داری نشان داد و در گروه های دریافت کننده عصاره خرنوب آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در مقایسه با گروه بوسولفان افزایش معنی داری نشان داد.<sup>۲۳</sup>

در مطالعه فرامرزی و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان داده شد که در محیط کشت freezing/thawing مکمل شده با خرنوب کیفیت اسپرم در نمونه های نرموزواسپرمیا بعد از freezing/thawing بهبود یافت.<sup>۲۴</sup>

دانه های خرنوب حاوی اسید گاما لینولنیک و آلفا لینولنیک اسید است که می تواند تبدیل به اسید چرب دی هموگاما و سپس به اسید آراشیدونیک (که پیش ساز همه پروستاگلاندین ها مانند تأثیر پروستاگلندین e2 می باشد) گردد. دانه خرنوب همچنین حاوی اسید آراشیدونیک می باشد که به نظر می رسد نقش عمده ای در بیضه از خود نشان می دهد.<sup>۲۱</sup> دانه های خرنوب سرشار از فیتواسترونهاست. این ترکیبات آنالوگ ساختاری کلسترول می باشد و توانایی جلوگیری از سرطان هایی مانند سرطان های پستان و پروستات را داراست و مصرف روزانه ۶۰۰ و ۳۰۰ mg/kg عصاره آبی - الکلی دانه خرنوب، غلظت تستوسترون سرم را بالا می برد.<sup>۲۱</sup>

از جمله ترکیبات موجود در عصاره خرنوب جنیستین می باشد. در مطالعه ای ویرما و همکاران در سال ۲۰۱۸ مشخص گردید که جنیستین بوسیله افزایش تشکیل لاکتات و آنزیم های آنتی اکسیدانسی القا شده توسط انسولین اسپرماتوژنز را بهبود می بخشد. بنابراین جنیستین می تواند سو عملکرد بیضه ای القا شده توسط دیابت نوع ۲ را در موش تصحیح کند.<sup>۲۵</sup>

در مطالعه جلیلی و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان داده شد که

از عملکردهای ضد تکثیر سلولی دوکسوروبیسین بر علیه سلول توموری تشکیل رادیکال های آزاد و پراکسیداسیون چربی ها می باشد.<sup>۲۷</sup> هر دو مکانیسم، خاص سلول های سرطانی نمی باشد و می توانند به آسیب سلول های سالم نیز منجر شوند.<sup>۲۸</sup> چنین پروسه هایی در سلول بیضه افرادی که با دوکسوروبیسین درمان می شوند نیز رخ می دهد. مطالعات قبلی نشان دادند که دوکسوروبیسین در موش نابالغ به آسیب برگشت ناپذیری به سلول های سرتولی و به اختلال شدید اسپرماتوژنز منجر می گردد.<sup>۲۹</sup> دوکسوروبیسین در موش نابالغ باعث صدمه به اسپرماتوگونی، و خسارت غیر قابل برگشت، به اسپرماتوژنز در بزرگسالان ناشی از آسیب سد خونی - بیضه توسط نسل رادیکال های آزاد با واسطه و پراکسیداسیون اشاره می کند.<sup>۳۰</sup>

به نظر می رسد که بهبودی در روند اسپرماتوژنز در گروه تجربی دریافت کننده داروی دوکسوروبیسین و دوز ۳۰۰ mg/kg عصاره هیدرو الکلی خرنوب ناشی از خاصیت آنتی اکسیدانسی عصاره گیاه خرنوب می باشد. در این مطالعه افزایش وزن بدن، تعداد سلول های اسپرماتوگونی و همچنین تعداد سلول های اسپرماتوسیت در مقایسه با گروه شاهد دریافت کننده دوکسوروبیسین بوضوح به چشم می خورد.

در گروه های تجربی دریافت کننده داروی دوکسوروبیسین و عصاره هیدرو الکلی گیاه خرنوب با دوز ۳۰۰ mg/kg میانگین تعداد سلول های اسپرماتید افزایش معنی داری را نسبت به گروه دریافت کننده دوکسوروبیسین نشان داد که ارائه دهنده خواص آنتی اکسیدانسی قوی<sup>۳۱</sup> و آنتی آپوپتوتیک<sup>۳۱</sup> عصاره خرنوب بر فرآیند اسپرماتوژنز در بافت بیضه می باشد. به نظر می رسد که نتایج این تحقیق با مطالعات گذشته همخوانی دارد.

در مطالعه مختاری و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داده شد که القای عصاره هیدرو الکلی دانه خرنوب سطوح هورمون های جنسی و تراکم اسپرم را در لوله های منی ساز افزایش می دهد.<sup>۲۱</sup> در مطالعه سلیمان زاده و همکاران در سال ۲۰۱۹ مشخص گردید که عصاره هیدرو الکلی میوه خرنوب مسمومیت تولید مثلی القا شده توسط سرب را در موش سوری نر تسکین می بخشد. در این مطالعه مشخص گردید که هم القایی عصاره هیدرو الکلی میوه خرنوب و

لینولئیک اسید به طور معنی‌داری تحرک و توانایی تحرک اسپرماتوزوآ را بهبود می‌بخشد. همچنین اولئیک اسید و آراشیدونیک اسید در همه دوره‌های انکوباسیون واکنش آکروزومی اسپرم را بهبود می‌بخشد.<sup>۴۲</sup>

نتایج نشان می‌دهد که عصاره هیدروالکلی خرنوب در دوزهای ۱۵۰ mg/kg و ۶۰۰ mg/kg منجر به تغییر معنی‌داری در تعداد سلول‌های زاینده و بازسازی بافت بیضه نمی‌گردد ولی دوز ۳۰۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی خرنوب منجر به افزایش معنی‌دار در تعداد سلول‌های زاینده و بازسازی بافت بیضه می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که اثرات حفاظتی عصاره هیدروالکلی خرنوب وابسته به دوز نمی‌باشد و تنها دوز ۳۰۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی خرنوب منجر به افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌های زاینده و بازسازی بافت بیضه می‌گردد که این اثرات حفاظتی مربوط به خواص آنتی‌اکسیدانتی، خنثی‌کننده رادیکال‌های آزاد، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، آنیون سوپراکسید ( $O_2^{\circ}$ )، پرواکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )، رادیکال پروکسیل ( $ROO^{\circ}$ )، یون هیپوکلریت ( $ClO^{\circ}$ ) و رادیکال بسیار فعال هیدروکسیل ( $OH^{\circ}$ ) می‌باشد و این دوز از عصاره هیدروالکلی خرنوب به عنوان دوز موثر در برابر سوء عملکرد بیضه ای القا شده توسط دوکسوربیسین می‌تواند بکار رود.

### نتیجه‌گیری کلی

به نظر می‌رسد که عصاره هیدروالکلی خرنوب در دوز ۳۰۰ mg/kg دارای اثر حفاظتی بر مسمومیت اسپرماتوزوآ القا شده توسط داروی دوکسوربیسین می‌باشد.

## References

- Jamalan M, Ghaffari MA, Hoseinzadeh P, Hashemitabar M, Zeinali M. Human sperm quality and metal toxicants: protective effects of some flavonoids on male reproductive function. *International journal of fertility & sterility* 2016 Jul;10(2):215.
- Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects.

القای جنیستین می‌تواند کیفیت اسپرماتوزوآ را افزایش داده و از اثرات جانبی القا شده توسط مورفین بر پارامترهای اسپرم پیشگیری کند.<sup>۳۶</sup> در مطالعه‌ی مغربی و در سال ۲۰۱۶ مشخص گردید که جنیستین استرس اکسیداتیو و صدمه اسپرماتوزوآ القا شده توسط رپرفیوژن و ایسکمی بیضه ای را بوسیله کاهش فعالیت سیستم متالوپروتئاز ماتریکس بیضه ای تسکین می‌بخشد.<sup>۳۷</sup>

در مطالعه چچی و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داده شد که جنیستین بطور موثری سطوح تستوسترون درون بیضه ای را کاهش می‌دهد و بازسازی اسپرماتوزوآ را در موش‌های صحرایی درمان شده با داروی بوسولفان - یک داروی شیمی‌درمانی - تحریک می‌کند.<sup>۳۸</sup> در مطالعه کیم و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داده شد که جنیستین صدمه بیضه ای القا شده توسط اشعه گاما را از طریق اثر ضد مرگ سلولی برنامه ریزی شده و بازسازی اسپرماتوزوآ کاهش می‌دهد.<sup>۳۹</sup>

از جمله ترکیبات موجود در عصاره خرنوب گالیک اسید می‌باشد. در مطالعه مهربان و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان داده شد که گالیک اسید می‌تواند مسمومیت تولید مثلی القا شده توسط سیکلوفسفامید را در موش‌های NMRI بالغ تصحیح‌کنند و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی بافت بیضه را افزایش دهد.<sup>۴۰</sup>

در مطالعه مهربان و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان داده شد که گالیک اسید دارای اثرات حفاظتی بر مرگ سلولی اسپرم و لقاح در شرایط *in vitro* در موش‌های نر بالغ درمان شده با سیکلوفسفامید می‌باشد.<sup>۴۱</sup>

از جمله ترکیبات موجود در عصاره خرنوب اولئیک اسید و لینولئیک اسید، آراشیدونیک اسید می‌باشند. در مطالعه حسین و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داده شد که اولئیک اسید و

Pharmacogenetics and genomics 2011 Jul;21(7):440.

- Brilhante O, Okada FK, Sasso-Cerri E, Stumpp T, Miraglia SM. Late morfofunctional alterations of the Sertoli cell caused by doxorubicin administered to prepubertal rats. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2012;10(1):79.
- Ghahreman A. *Plant Systematics Cormophytes of Iran*. 2nd ed, Tehran: Unive Med Sci 1998: 508-510.



5. Papagiannopoulos M, Wollseifen HR, Mellenthin A, Haber B, Galensa R. Identification and quantification of polyphenols in Carob Fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MS n. *Journal of agricultural and food chemistry* 2004;52(12):3784-91.
6. Azab A. Carob (*Ceratonia siliqua*): Health, medicine, chemistry. *European Chemical Bulletin* 2017;6(10):456-69.
7. Dakia PA, Wathélet B, Paquot M. Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ. *Food Chemistry* 2007;102(4):1368-74.
8. Alzoubi KH, Alibbini S, Khabour OF, El-Elimat T, Alzubi M, Alali FQ. Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Prevents Short-Term Memory Deficit Induced by Chronic Stress in Rats. *Journal of Molecular Neuroscience* 2018 ; 66 (3) : 314-21.
9. Goulas V, Stylos E, Chatziathanasiadou M, Mavromoustakos T, Tzakos A. Functional components of carob fruit: Linking the chemical and biological space. *International journal of molecular sciences* 2016 ; 17(11):1875.
10. Qasem MA, Noordin MI, Arya A, Alsalahi A, Jayash SN. Evaluation of the glycemic effect of *Ceratonia siliqua* pods (Carob) on a streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rat model. *PeerJ*. 2018;6:e4788.
11. Al-Olayan EM, El-Khadragy MF, Alajmi RA, Othman MS, Bauomy AA, Ibrahim SR, Moneim AE. *Ceratonia siliqua* pod extract ameliorates *Schistosoma mansoni*-induced liver fibrosis and oxidative stress. *BMC complementary and alternative medicine* 2016;16(1):434.
12. Rtibi K, Selmi S, Grami D, Saidani K, Sebai H, Amri M, Eto B, Marzouki L. *Ceratonia siliqua* L.(immature carob bean) inhibits intestinal glucose absorption, improves glucose tolerance and protects against alloxan-induced diabetes in rat. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2017;97(8):2664-70.
13. Lakkab I, El Hajaji H, Lachkar N, El Bali B, Lachkar M, Ciobica A. Phytochemistry, bioactivity: suggestion of *Ceratonia siliqua* L. as neurodegenerative disease therapy. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* 2018;15(4).
14. Rtibi K, Jabri MA, Selmi S, Souli A, Sebai H, El-Benna J, Amri M, Marzouki L. Gastroprotective effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) against ethanol-induced oxidative stress in rat. *BMC complementary and alternative medicine* 2015;15(1):292.
15. Souli A, Sebai H, Chehimi L, Rtibi K, Tounsi H, Boubaker S, Sakly M, El-Benna J, Amri M. Hepatoprotective effect of carob against acute ethanol-induced oxidative stress in rat. *Toxicology and industrial health* 2015;31(9):802-10.
16. Agrawal A, Mohan M, Kasture S, Foddiss C, Frau MA, Loi MC, Maxia A. Antidepressant activity of *Ceratonia siliqua* L. fruit extract, a source of polyphenols. *Natural product research* 2011;25(4):450-6.
17. Ata A, Yildiz-Gulay O, Güngör S, Balic A, Gulay MS. The effect of carob (*Ceratonia siliqua*) bean extract on male New Zealand White rabbit semen. *World Rabbit Science* 2018;26(3):209-15.
18. Mahdiani E, Khadem Haghghighian H, Javadi M, Karami AA, Kavianpour M. Effect of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) oral supplementation on changes of semen parameters, oxidative stress, inflammatory biomarkers and reproductive hormones in infertile men. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences* 2018;23(3):56-66.
19. Jain H, Parial SD, Jarald E, Daud AS, Ahmad S. Extraction of Ashwagandha by conventional extraction methods and evaluation of its anti-stress activity. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)* 2010;4(3) : 183-185.
20. Germano MP, D'Angelo V, Sanogo R, Morabito A, Pergolizzi S, De Pasquale R. Hepatoprotective activity of *Trichilia roka* on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2001 ;53(11):1569-74.
21. Mokhtari M, Sharifi E, Sh A. The effects of hydro alcoholic extract of *Ceratonia siliqua* L. seeds on pituitary--testis hormones and spermatogenesis in rat. *Advances in Environmental Biology* 2012;1:2778-84.
22. Bazrafkan M, Sobhani A. Study of Spermatogenesis in Wistar Adult Rats Administrated to Long Term of *Ruta Graveolens*. *Jentashapir Journal of Health Research* 2014;5(4).
23. Zanetti SR, Maldonado EN, Aveladano MI. Doxorubicin affects testicular lipids with long-chain (C18-C22) and very long-chain (C24-C32) polyunsaturated fatty acids. *Cancer research* 2007;67(14):6973-80.
24. Hou MI, Chrysis D, Nurmio M, Parvinen M, Eksborg S, Söder O, Jahnukainen K. Doxorubicin induces apoptosis in germ line stem cells in the immature rat testis and amifostine cannot protect against this cytotoxicity. *Cancer research* 2005;65(21):9999-10005.
25. Brillhante O, Okada FK, Sasso-Cerri E, Stumpp T, Miraglia SM. Late morfofunctional alterations of the Sertoli cell caused by doxorubicin administered to prepubertal rats. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2012;10(1):79.
26. Silva RC, Britto DM, de Fátima Pereira W, Brito-Melo GE, Machado CT, Pedreira MM. Effect of short-and medium-term toxicity of doxorubicin on spermatogenesis in adult Wistar rats. *Reproductive biology*. 2018 Jun 1;18(2):169-76.
27. Gewirtz D. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical pharmacology* 1999;57(7):727-41.

28. Kang JK, Lee YJ, No KO, Jung EY, Sung JH, Kim YB, Nam SY. Ginseng intestinal metabolite-I (GIM-I) reduces doxorubicin toxicity in the mouse testis. *Reproductive Toxicology* 2002;16(3):291-8.
29. Stumpp T, Freymüller E, Miraglia SM. Sertoli cell function in albino rats treated with etoposide during prepubertal phase. *Histochemistry and cell biology* 2006 ;126(3):353-61.
30. Vendramini V, Sasso-Cerri E, Miraglia SM. Amifostine reduces the seminiferous epithelium damage in doxorubicin-treated prepubertal rats without improving the fertility status. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2010 ;8(1):3.
31. Lachkar N, Al-Sobarry M, El Hajaji H, Lamkinsi T, Lachkar M, Cherrah Y, Alaoui K. Anti-inflammatory and antioxidant effect of *Ceratonia siliqua* L. methanol barks extract. *J. Chem. Pharm. Res.* 2016;8:202-10.
32. Soleimanzadeh A, Kian M, Moradi S, Mahmoudi S. Carob (*Ceratonia siliqua* L.) fruit hydro-alcoholic extract alleviates reproductive toxicity of lead in male mice: Evidence on sperm parameters, sex hormones, oxidative stress biomarkers and expression of Nrf2 and iNOS. *Avicenna Journal of Phytomedicine* 2019 Jul 20.
33. 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):104-11.
34. Faramarzi A, Aghaz F, Golestan Jahromi M, Bakhtiari M, Khazaei M. Does supplementation of sperm freezing/thawing media with *Ceratonia siliqua* improve detrimental effect of cryopreservation on sperm parameters and chromatin quality in normozoospermic specimens? *Cell Tissue Bank* 2019 . doi: 10.1007 /s 10561-019-09779-2.
35. Verma R, Samanta R, Krishna A. Comparative Effects of Estrogen and Phytoestrogen, Genistein on Testicular Activities of Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetic Mice. *Reproductive Sciences* 2018 Dec 5:1933719118815576.
36. Jalili C, Ahmadi S, Roshankhah S, Salahshoor M. Effect of Genistein on reproductive parameter and serum nitric oxide levels in morphine-treated mice. *International journal of reproductive biomedicine* 2016 ;14(2):95.
37. Al-Maghrebi M, Renno WM. Genistein alleviates testicular ischemia and reperfusion injury-induced spermatogenic damage and oxidative stress by suppressing abnormal testicular matrix metalloproteinase system via the Notch 2/Jagged 1/Hes-1 and caspase-8 pathways. *J Physiol Pharmacol.* 2016 ;67(1):129-37.
38. Chi H, Chun K, Son H, Kim J, Kim G, Roh S. Effect of genistein administration on the recovery of spermatogenesis in the busulfan-treated rat testis. *Clinical and experimental reproductive medicine* 2013 ;40(2) :60 -6.
39. Kim JS, Heo K, Yi JM, Gong EJ, Yang K, Moon C, Kim SH. Genistein mitigates radiation-induced testicular injury. *Phytotherapy research* 2012 ;26(8):1119-25.
40. Mehraban Z, Ghaffari Novin M, Golmohammadi MG, Sagha M, Ziai SA, Abdollahifar MA, Nazarian H. Protective Effect of Gallic Acid on Testicular Tissue, Sperm Parameters, and DNA Fragmentation against Toxicity Induced by Cyclophosphamide in Adult NMRI Mice. *Urol J.* 2019 Mar 18. doi: 10.22037/uj.v0i0.4858.
41. Mehraban Z, Ghaffari Novin M, Golmohammadi MG, Sagha M, Pouriran K, Nazarian H. Protective effect of gallic acid on apoptosis of sperm and in vitro fertilization in adult male mice treated with cyclophosphamide. *Journal of cellular biochemistry* 2019 May 28. doi: 10.1002/jcb.28987.
42. Hossein MS, Tareq KM, Hammano KI, Tsujii H. Effect of fatty acids on boar sperm motility, viability and acrosome reaction. *Reproductive medicine and biology* 2007 ;6(4):235-9.

Hengameh Mehdikhani<sup>1</sup>,  
 Mehrdad Shariati<sup>2\*</sup>,  
 Mohsen Forozanfar<sup>3</sup>, Seyed  
 Ebrahim Hosseini<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Ph.D Student of  
 Developmental Biology,  
 Department of Biology, Shiraz  
 Branch, Islamic Azad  
 University, Shiraz, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor,  
 Department of Biology,  
 Kazerun Branch, Islamic Azad  
 University, Kazerun, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor,  
 Department of Biology,  
 Marvdasht Branch, Islamic  
 Azad University, Marvdasht,  
 Iran

<sup>4</sup> Associate Professor,  
 Department of Biology, Shiraz  
 Branch, Islamic Azad  
 University, Shiraz, Iran

## Protective Effect of Hydroalcoholic Extract of Carob (Ceratonia Siliqua) on Testicular Tissue in Adult Rats Treated with Doxorubicin

Received: 28 Jul. 2019 ; Accepted: 30 Jun. 2020

### Abstract

**Background:** Doxorubicin is one of the most commonly used anticancer drugs. The purpose of this study was to investigate the protective effect of hydroalcoholic extract of Carob (Ceratonia Siliqua) on testicular tissue in adult rats treated with doxorubicin.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 56 adult male Wistar rats were used in 8 groups of seven. The control group received only ordinary water and food. The sham group received distilled water at a dose of 3 mg / kg by intraperitoneal injection. The sham group 1 received dose of doxorubicin (3mg / kg) once weekly for 4 weeks intraperitoneally. The sham group 2 group received (600 mg / kg) maximum dose of hydroalcoholic extract of Carob (Ceratonia Siliqua) for 48 days by gavage method. Experimental groups 1, 2 and 3 received doxorubicin with 3 mg/kg once weekly for 4 weeks intraperitoneally and 150, 300 and 600 mg / kg of hydroalcoholic extract of Carob (Ceratonia Siliqua) for 48 days with gavage method. Hematoxylin-eosin staining method was used to test the testicular tissue.

**Results:** The mean body weight, number of spermatogonial cells, spermatocyte count, spermatocyte count and number of leydig cells in the experimental group receiving doxorubicin and 300 mg / kg dose of hydroalcoholic extract of Carob (Ceratonia Siliqua) increased significantly compared to the group receiving doxorubicin. In experimental groups receiving doxorubicin and 150 and 600 mg / kg doses of hydroalcoholic extracts of Carob (Ceratonia Siliqua), the mean number of spermatogonia, spermatocyte, spermatid and leydig cells decreased significantly compared to control and sham groups (P <0.05). Histologic studies also showed that the amount of shrinkage in testicular tissue in the experimental group receiving doxorubicin and 300 mg / kg dose of hydroalcoholic extract of Carob (Ceratonia Siliqua) , as compared with the group receiving doxorubicin, was decreased, which indicates the effect of this dose on the recovery of testicular tissue.

**Conclusion:** Hydroalcoholic extract of 300 mg / kg dose of Carob (Ceratonia Siliqua) has a protective effect on spermatogenesis poisoning induced by doxorubicin.

**Keywords:** Carob (Ceratonia Siliqua), Doxorubicin, Testis, Rat

**\*Corresponding Author:**  
 Department of Biology,  
 Kazerun Branch, Islamic Azad  
 University, Kazerun, Iran

Tel: 09173133221  
 E-mail: mehrdadshariati@hotmail.com