نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۴۰۱؛ ۱۶(۲):۹-۱۶.
http://doi.org/ 10.22034/ijvcs.2022.10192.1009

اثر محافظتی گیاه خرفه بر آسیب‌های ناشی از اثرات سمی بوسولفان در دستگاه تولید مثلی نر در مدل حیوانی رت

فروتن صالحی‌نژاد[1]، سیده ام‌البنین قاسمیان[1*]

۱. گروه دامپزشکی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان- ایران.

دریافت: ۱۷. دی‌ماه ۱۴۰۰ **پذیرش:** ۱۱ مهرماه ۱۴۰۱

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و محافظتی عصاره گیاه خرفه بر آسیب‌های توکسیک ناشی از تجویز بوسولفان بر برخی شاخص‌های اسپرمی در دستگاه تناسلی مدل رت نر بود. ۴۰ سر موش نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۸۰ گرم به طور تصادفی به ۴ گروه ۱۰ تایی شامل، گروه‌های دریافت کننده بوسولفان، بوسولفان+غلظت ۵ درصد عصاره خرفه، بوسولفان+غلظت ۱۰ درصد عصاره خرفه به مدت ۵ هفته و گروه کنترل تقسیم شدند. میانگین شاخص‌های اسپرمی مانند درصد اسپرم‌های زنده، اسپرم‌های متحرک پیش رونده در هرگروه مقایسه شدند. میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز،کاتالاز و مالون دی-آلدئید در بیضه رت‌ها ارزیابی و مقایسه شد، همچنین بررسی‌های بافت‌شناسی در گروه‌های مختلف انجام شد. میانگین هر سه شاخص اسپرم به طور معنی‌داری در گروه بوسولفان نسبت به همه گروه‌ها کاهش نشان داد (P<۰/۰۵). بیشترین میزان مالون دی‌آلدئید و کمترین فعالیت آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز مربوط به گروه بوسولفان، سپس هر دو غلظت عصاره خرفه و گروه کنترل بود (P<۰/۰۵). فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه‌های بوسولفان و دو غلظت ۵ و ۱۰٪ عصاره خرفه اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵) و گروه کنترل بیشترین فعالیت آنزیمی کاتالاز نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد (P<۰/۰۵). نتایج هیستوپاتولوژی، نشان از بالاتر بودن امتیازدهی جانسون در هر دو گروه درمانی نسبت به گروه بوسولفان و کمتر بودن آن نسبت به گروه کنترل داشت(P<۰/۰۵). نتایج نشان داد عصاره خرفه بدون وابستگی به غلظت می‌تواند اثرات توکسیک ناشی از بوسولفان در دستگاه تولید مثلی نر و اسپرماتوژنز را از طریق کاهش اکسیداسیون اسیدهای چرب غشا و افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: بوسولفان، خرفه، کاتالاز، مالون دی‌آلدئید، سوپراکسید دیسموتاز، شاخص‌های اسپرمی

مقدمه

بوسولفان یک داروی شیمی درمانی است که به طور گسترده در درمان سرطان استفاده می‌شود. بوسولفان در درمان سرطان‌های مختلف از جمله لنفوم و لوسمی و همچنین در موارد پیوند اعضا اثرات مفیدی بر طول عمر بیماران ادارد، هر چند استفاده طولانی مدت آن منجر به ایجاد ناباروری از طریق القای استرس اکسیداتیو می شود (۸). بین ۲۰ تا ۲۵ درصد از مردان جوان مبتلا به سرطان بیضه دچار مشکل باروری هستند (۱۷). عوامل متعددی با تأثیر بر اسپرماتوژنز، باعث کاهش کیفیت و میزان تولید اسپرم می‌گردند (۲۵)؛ اگرچه بوسولفان دارای اثرات مفیدی بر طول عمر بیماران است. یکی از اثرات جانبی تجویز درازمدت داروهای شیمی درمانی مانند بوسولفان در درمان سرطان به ویژه لنفوم و لوسمی و همچنین در پیوند اعضا القای ناباروری از طریق القای استرس اکسیداتیو است (۸). مطالعات نشان داده که برخی درمان‌های خوراکی مانند ملاتونین، ال-کارنیتین، آتورواستاتین، آرژینین، سلنیوم، روی، ویتامین B12 و نیز آنتی‌اکسیدان‌های زیادی مثل ویتامین C، ویتامین E، کوآنزیم Q10 و گلوتاتیون، سبب بهبود شاخص‌های اسپرم (مانند حرکت اسپرم و تعداد اسپرم) و در نتیجه افزایش باروری می‌شوند(۲۰ و ۲۶). استفاده از عصاره‌های گیاهی یا داروهای گیاهی به عنوان موادی با فعالیت ضد میکروبی، بهبود دهنده رشد و بهبود دهنده اشتها شناخته می‌شوند و به عنوان یکی دیگر از مهم‌ترین جایگزین‌ها برای آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای شیمیایی توجه‌های زیادی را به سمت خود معطوف کرده‌اند. ویژگی‌های ضد استرسی گیاهان باعث می‌شود که تحت شرایط استرس و بیماری‌های عفونی استفاده وسیعی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Ghasemian1249@yahoo.com

از این مواد صورت گیرد بدون این که خطری را برای انسان و محیط زیست در بر داشته باشد (۲۱). استفاده از عصاره‌های گیاهی یا تولیدات آن‌ها در غلظت‌های مختلف از طریق خوراکی یا به صورت تزریقی باعث افزایش پاسخ ایمنی ذاتی و ایمنی اکتسابی در مقابل بیماری‌های انگلی، باکتریایی و ویروسی می‌شود (۳، ۹، ۲۱، ۲۲و۲۳).پژوهش‌های زیادی فعالیت متعدد عصاره‌های گیاهی را به اثبات رسانده‌است که شامل فعالیت ضد استرسی، تحریک اشتها، بهبود افزایش وزن، تحریک ایمنی، تقویت قوای جنسی و افزایش مقاومت در برابر پاتوژن‌هاست و این فعالیت‌ها بر اثر موادی مثل الکالوئیدها، ترپونوئیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، گلیکوزیدها، فلاونوئیدها، فنولیک‌ها، استروئیدها یا اسیدهای چرب ضروری موجود در این گیاهان است (۱ و ۷). از بین گیاهان مختلف، گیاه خرفه با نام علمی *Portulacaoleracea L* از جمله گیاهان دارویی مهم است که بومی ایران است و خواصی مانند ضد اسکوربوت، معالج سرفه‌های مقاوم، تصفیه خون، مسکن، تشنگی، مفید در ترمیم سوختگی‌ها دارد و نیز اثرات ضد درد و ضد التهاب نیز دارد. نام «Portulaca» از نام لاتین'Porto' به معنی حمل کردن و 'lac' به معنی شیر گرفته شده است؛ زیرا گیاه دارای شیرابه شیری است. خرفه حاوی مقادیر فراوانی کاته‌کولامین‌ها، نوروآدرنالین و دوپامین است که این مواد از اصلی‌ترین اجزا با فعالیت زیستی به شمار می‌روند. به نظر می‌رسد که کاته‌کولامین‌ها از مهم‌ترین ترکیبات برای مداوای شوک باشند. برخی مطالعات بیانگر این حقیقت است که نوروآدرنالین و دوپامین موجود در این گیاه شرط اصلی برای داشتن خواص ضد سرطانی است (۲۴). مطالعات اخیر نشان داده اند که خرفه منبع غنی از اسیدهای چرب امگا- ۳ است که پیش ماده‌ی برخی از هورمون‌های ویژه (پروستاگلندین)هاست و برای جلوگیری از حملات قلبی، وقوع سرطان و تقویت سیستم ایمنی مهم است (۱۰ و ۱۱). برخی پژوهشگران گزارش کردند که خرفه و گیاهانی که دارای ترکیبات فنلی هستند خواص ضد التهابی، ضد باکتریایی و ضد قارچی از خود نشان می‌دهند (۱۱). خرفه حاوی ترکیبات فلاونوئیدی نظیر کامفرول، کوئرسین است که اثرات ضدمیکروبی از خود نشان می‌دهند (۱۱). با توجه به مطالب یاد شده به نظر می‌رسد که خرفه به دلیل داشتن ارزش تغذیه‌ای بالا و نیز خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد دیابت و ضد میکروبی در آینده اهمیت بیشتری پیدا کرده و قابلیت لازم برای تغذیه و تقویت سیستم ایمنی انسان را داشته باشد (۱۸). برخی مطالعات نشان داده‌اند که عصاره‌های گیاهی خرفه در سلول‌های کبدی آزمایش شده، دارای توانایی حفاظت از سلول‌های کبدی علیه مرگ سلولی تحریک شده به وسیله پراکسید هیدروژن با مهار استرس‌های اکسایشی و مهار تولید گونه‌های فعال اکسیژن است(۴)، همچنین بررسی تأثیر عصاره گیاه خرفه بر الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های خون در موش نشان داد که، عصاره خرفه توانسته بدون ایجاد تحریک آنتی ژنیکسبب تقویت سیستم ایمنی گردد. از سوی دیگر افزایش گلبولین‌های سرم در این مطالعه به این معناست که عصاره خرفه می‌تواند تأثیر فزاینده‌های روی فعالیت سیستم ایمنی در موش‌های سوری داشته باشد (۵). پژوهش حاضر به دنبال یافتن اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه خرفه همزمان با مصرف بوسولفان است، بنابراین با توجه به نقش آنتی‌اکسیدانی گیاه خرفه در دستگاه‌های مختلف از جمله دستگاه تولیدمثلی نر، در این مطالعه نقش محافظتی گیاه خرفه روی شاخص‌های اسپرم واختلال فعالیت‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدان ناشی از بوسولفان در رت نر طراحی شد.

مواد و روش کار

در ابتدا گیاه خرفه از استان‌های گیلان و مازندران، شناسایی و تهیه شد و پس از آن برگ و ساقه آن که قسمت‌های موثر این گیاه است، جدا گشته، سپس با آب مقطر شست و شو شدند، پس از آن این گیاه در محیط خشک و تاریک، به دور از نور خورشید و در جریان هوا خشک می شود، سپس با یک همزن الکتریکی پودر می‌شود، سپس به ازای هر گرم خرفه پودر شده، مقدار ۲۰cc متانول ۴۰٪ به آن اضافه می شود و محلول تهیه شده به مدت سه روز روی دستگاه شیکر قرار می‌گیرد و بعد از گذشت زمان لازم، محلول تهیه شده با کاغذ صافی واتمن شماره چهار صاف می‌شود. عصاره به دست آمده با دستگاه روتاری تغلیظ شده و باقی‌مانده حلّال نیز در دمای آزمایشگاه تبخیر می‌شود.

دراین پژوهش،۴۰ سرموش صحرایی نر بالغ جنسی نژادWistar با وزن تقریبی۲۵۰-۲۲۰گرم وسن تقریبی ۳-۲ ماه از خانه حیوانات بیمارستان خاتم خریداری شد. در ابتدا موش‌ها به منظورسازگاری با محیط به مدت ۲ هفته؛ ۱۲ ساعت درتاریکی و ۱۲ ساعت درروشنایی بودند و آب وغذای کافی دراختیارآن‌ها قرارگرفت. رت‌ها به صورت تصادفی در ۴گروه، هرگروه شامل۱۰سرموش، تقسیم شدند. رت‌های گروه بوسولفان و گروه‌های درمانی عصاره خرفه بعداز انطباق با محیط، داروی بوسولفان شرکت سیگما (B2635-25g) ساخت کشورآمریکا را دو نوبت با فاصله دو هفته با دوز ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم داخل صفاقی دریافت کردند (۲۶). گروه شم فقط حلال بوسولفان یا DMSO و گروه کنترل نرمال سالین به میزان ۰/۲ میلی لیتر داخل صفاقی دریافت کردند. در گروه درمانی عصاره گیاه خرفه با دو غلظت به صورت ۱۰ و ۵ درصد خوراکی روزانه به مدت ۵ هفته صورت می‌گرفت، پس ازگذشت۵ هفته، حیوانات بی‌هوش و سپس سکریفای شدند.

به منظور ارزیابی شاخص‌های مربوط به اسپرم مانند درصد اسپرم‌های زنده واسپرم‌های غیرمتحرک و تعداد کل اسپرم، دم اپیدیدیم جدا شد و در یک پتری‌دیش تکه تکه شد ودر ۱ میلی‌لیتر محلولHTF به مدت ۱۰ دقیقه درشرایط ۳۷℃ و رطوبت ۵ درصد انکوبه شد و با سمپلر ازمایع رویی پس‌از تکان دادن میکروتیوب،۱۰ میکرولیتر از محلول را برداشته شد و روی اسپرم چمبر قرار گرفت و در زیر میکروسکوپ درصد اسپرم‌های متحرک اندازه‌گیری شد، سپس سوسپانسیون اسپرم با دور ۱۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. پس از اتمام سانتریفیوژ، محلول رویی هر فالکون با پیپت پاستور یا سمپلر دور ریخته شد و پلیت‌های حاوی اسپرم در هر لوله، با پیپت پاستور یا سمپلر جمع و به یک لوله منتقل گردید. نمونه‌های بافت بیضه جدا و تا انجام آزمایش‌های آنتی‌اکسیدان درفریزر ۷۰- نگه‌داری شدند.

تعیین میزان زنده‌مانی اسپرم به این صورت انجام گردیدکه: ۲۰ میکرولیتر از رنگ Eosin Y- Nigroson به حجم مساوی سوسپانسیون اسپرم اضافه شده و پس از انکوباسیون در دمای اتاق، زیر میکروسکوپ نوری مشاهده گردید. رنگ ائوزین فقط اسپرم‌های مرده را رنگ می‌کند و به صورت صورتی تیره نمایان می‌کند درحالی که اسپرم‌های زنده سفید باقی می‌مانند. تعیین غلظت اسپرم-ها به روش Zangoie و همکاران در سال ۲۰۱۹، با لام نئوبار انجام شد (۲۶).

برای نرمالیزه کردن فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و SOD و میزان مالون دی آلدئید، پروتئین تام اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری پروتئین تام از محلول آماده Bradford محصول شرکت سیگما استفاده شد. نخست ۱/۵ میکرولیتر از هر نمونه سرمی به ۲۰۰ میکرو لیتر معرف برادفورد اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. برای تهیه بلانک، ۱/۵ میکرو لیتر از محلول PBS به ۲۰۰ میکرو لیتر معرف برادفورد اضافه گردید و همراه با نمونه‌ها در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و جذب نوری در طول‌موج۵۹۵ nm خوانده شد.برای سنجش نهایی از معادله استاندارد تهیه‌شده از پروتئینBovine Serum Albumin (BSA) استفاده گردید. به منظور تهیه معادله استاندارد از پروتئین BSA با غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰، ۱۲۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد و جذب نوری هر غلظت با محلول آماده برادفورد در طول‌موج۵۹۵ nm خوانده شد، سپس با اعداد به‌دست‌آمده، معادله استاندارد تهیه شد. با جذب نوری نمونه‌ها و معادله تهیه‌شده، غلظت پروتئین کل نمونه‌ها محاسبه گردید. معادله استاندارد به شرح زیر است:

$$C_{\mu g/ml} = \frac{OD-0.001}{0.454}$$

C: غلظت پروتئین کل؛ OD: جذب نوری نمونه

برای بررسی فعالیت کاتالاز و SOD تست از کیت شرکت کیا زیست پیشرو همدان طبق دستور شرکت سازنده استفاده شد.

با محاسبه پروتئین تام نمونه‌ها نرمال سازی مقادیر SODانجام گردید و به صورت IU/mg گزارش شد. µMکاتالاز هر نمونه طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{فعالیت کاتالاز nmol/min/mL} = X\frac{0/24}{0/02}X\ \frac{\mu M \text{ نمونه}}{20}$$

با محاسبه پروتئین تام نمونه‌ها نرمال سازی مقادیر کاتالاز انجام و به صورت nmol/min/mg گزارش شد.

برای اندازه‌گیری مالون‌دی-آلدئید با آزمون TBARS

(Thiobarbituric acid reactive substances) بـه ایـن صورت عمل شد که مقدار ۹۰۰ میکرو لیتـر از ۱۰۰ میلـی لتیر محلول‌کار شامل، محلول اسید کلریدریک ۰/۲۵ نرمال حـاوی ۰/۳۷۵ گـرم از تیوباربیتوریـک و ۱۵ گـرم اسـید کلرواسـتیک سـاخته شـده را بـرای هـر نمونـه داخـل میکروتیوب ریخته و ۱۰۰ میکرولیتـر ازنمونـه‌هـای بافـت آماده شده به آن اضافه گردیـد. بـرای تهیـه بلانـک، ۱۰۰ میکرولیتر از محلـول بـافر فسـفات بـه ۹۰۰ میکرولیتـر از محلول تهیه شده افزوده شد، سـپس تمـامی نمونـه‌هـا بـه مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری در آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله بعد نمونه‌ها از بن ماری خـارج و در دمای اتاق سرد شد، سپس نمونه‌ها با سـرعت ۲۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویـی برداشـته و جذب نوری هر نمونه درون دسـتگاه اسـپکتوفتومتر مـدل JENWAY 6305 در مقابل بلانک در طول مـوج ۵۳۵ nm خوانده شد. در نهایت با فرمول زیر غلظت مالون‌دی‌آلدئید محاسبه گردید:

$$C_{\mu M/L} = \frac{OD*100}{1/56}$$

C: غلظت مالون دی آلدئید؛ OD: جذب نوری نمونه
µM/L: میکرو مولار بر لیتر

بـرای ارزیـابی هسـیتوپاتولوژی نمونـه‌هـای بیضـه در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد، سپس بعد از گذشـت ۲۴ ساعت فرمالین تعویض و به منظـور پروسـه بافـت و رنـگ امیزی هماتوکسیلین ائوزین بـه آزمایشـگاه ارسـال گردیـد نمونه‌ها از نظر بافت‌شناسـی ارزیـابی شـدند و امتیـازدهی جانسون برای هر گروه محاسبه گردید (جدول ۱).

بـرای مقایسـه میـانگین داده‌هـا از نـرم افـزار SPSS ویرایش ۲۲ استفاده شد. مقایسه متغیرها بین گـروه‌هـا بـا آنالیز آماری واریانس یک طرفه انجـام شـد. بـرای بررسـی معنی‌داری در سطح p کمتر از ۰/۰۵ از آنالیز آماری توکی استفاده شد.

جدول ۱- امتیازدهی جانسون برای تغییرات پاتولوژی بیضه

امتیازدهی	یافته‌های بافت‌شناسی
۱۰	بافت طبیعی با اسپرماتوژنز کامل
۹	اسپرماتوزا فراوان، بافت پوششی لایه زایا با سلول‌های لایه زایا مشخص است، مجرای لوله‌ها پر.
۸	کمتر از ۵ تا ۱۰ اسپرماتوزا در هر مقطع عرضی لوله.
۷	اسپرماتوزا دیده نمی‌شود، اسپرماتید، اسپرماتوسیت و اسپرماتوگونی متعدد.
۶	اسپرماتوزا دیده نمی شود ۵ تا ۲۰ اسپرماتید، اسپرماتوسیت و اسپرماتوگونی در هر مقطع عرضی دیده می‌شود.
۵	اسپرماتوزا و اسپرماتید دیده نمی شود، اسپرماتوسیت و اسپرماتوگونی متعدد دیده می‌شود.
۴	اسپرماتوزا و اسپرماتید دیده نمی‌شود، کمتر از ۵ اسپرماتوسیت دیده می‌شود و اسپرماتوگونی متعدد است.
۳	اسپرماتوگونی دیده نمی شود.
۲	سلول لایه زایا دیده نمی شود و فقط سلول‌های سرتولی وجود دارد.
۱	سلول در لوله های وجود ندارد.

نتایج

گروه بوسولفان با گروه‌های کنترل (P<۰/۰۰۱)، غلظت ۱۰٪ عصاره خرفه (P<۰/۰۰۱) و غلظت ۵٪ عصـاره خرفـه (P<۰/۰۰۱) اختلاف معنـی‌داری از نظـر میـانگین درصـد اسپرم‌های متحرک نشان داد، همچنـین گـروه کنتـرل بـا گـروه غلظـت ۱۰٪ (P=۰/۰۰۱)، و غلظـت ۵٪(P<۰/۰۰۱) عصاره خرفه اختلاف معنـی‌داری از نظـر میـانگین درصـد اسپرم‌های متحرک نشان داد. میانگین درصد اسـپرم هـای متحرک گروه غلظت ۱۰٪ و غلظت ۵٪ عصاره خرفه اختلاف معنی‌داری نشان ندادند (P>۰/۰۵) (شکل ۱ الف).

گروه بوسولفان با گروه‌های کنترل (P<۰/۰۰۱)، غلظت ۱۰٪ (P=۰/۰۰۱)، و غلظت ۵٪(P<۰/۰۰۱) عصـاره خرفـه اختلاف معنی‌داری از نظر میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیش رونده، نشان داد، همچنـین گـروه کنتـرل بـا گـروه غلظـت ۱۰٪ (P=۰/۰۰۱) و غلظـت ۵٪(P<۰/۰۰۱) عصاره خرفه اختلاف معنـی‌داری از نظـر میـانگین درصـد اسپرم‌های دارای حرکت پیش رونـده نشـان داد. میـانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیش رونـده گـروه غلظـت

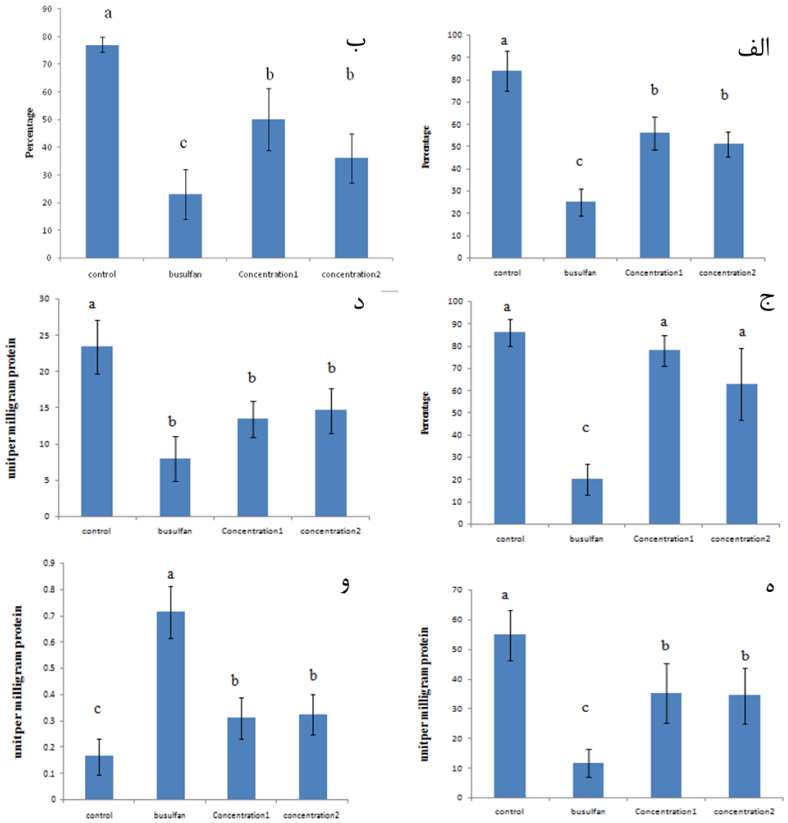
۱۰٪ و غلظت ۵٪ عصاره خرفه اختلاف معنی‌داری نشان ندادند (P>۰/۰۵)(شکل ۱ ب).

گروه بوسولفان با گروه‌های کنترل (P<۰/۰۰۱)، غلظت ۱۰٪ (P<۰/۰۰۱)، و غلظت ۵٪(P<۰/۰۰۱) عصاره خرفه اختلاف معنی‌داری از نظر میانگین درصد اسپرم‌های زنده نشان داد، همچنین گروه کنترل با گروه غلظت ۱۰٪ (P=۰/۰۱۳)، و غلظت ۵٪(P=۰/۰۰۱) عصاره خرفه اختلاف معنی‌داری از نظر میانگین درصد زنده‌های دارای حرکت پیش رونده نشان داد. میانگین درصد اسپرم‌های زنده گروه غلظت ۱۰٪ و غلظت ۵٪ عصاره خرفه اختلاف معنی‌داری نشان ندادند (P>۰/۰۵) (شکل ۱ ج).

گروه کنترل با گروه‌های بوسولفان (P<۰/۰۰۱)، غلظت ۱۰٪ (P=۰/۰۰۱)، و غلظت ۵٪(P=۰/۰۰۲) عصاره خرفه اختلاف معنی‌داری از نظر میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد. میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز گروه غلظت ۵٪ عصاره خرفه و بوسولفان اختلاف معنی‌داری از نظر میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز وجود داشت (P=۰/۰۱۸) و گروه غلظت ۱۰٪ عصاره خرفه و بوسولفان اختلاف معنی‌داری از نظر میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز نشان ندادند (P>۰/۰۵) (شکل ۱د).

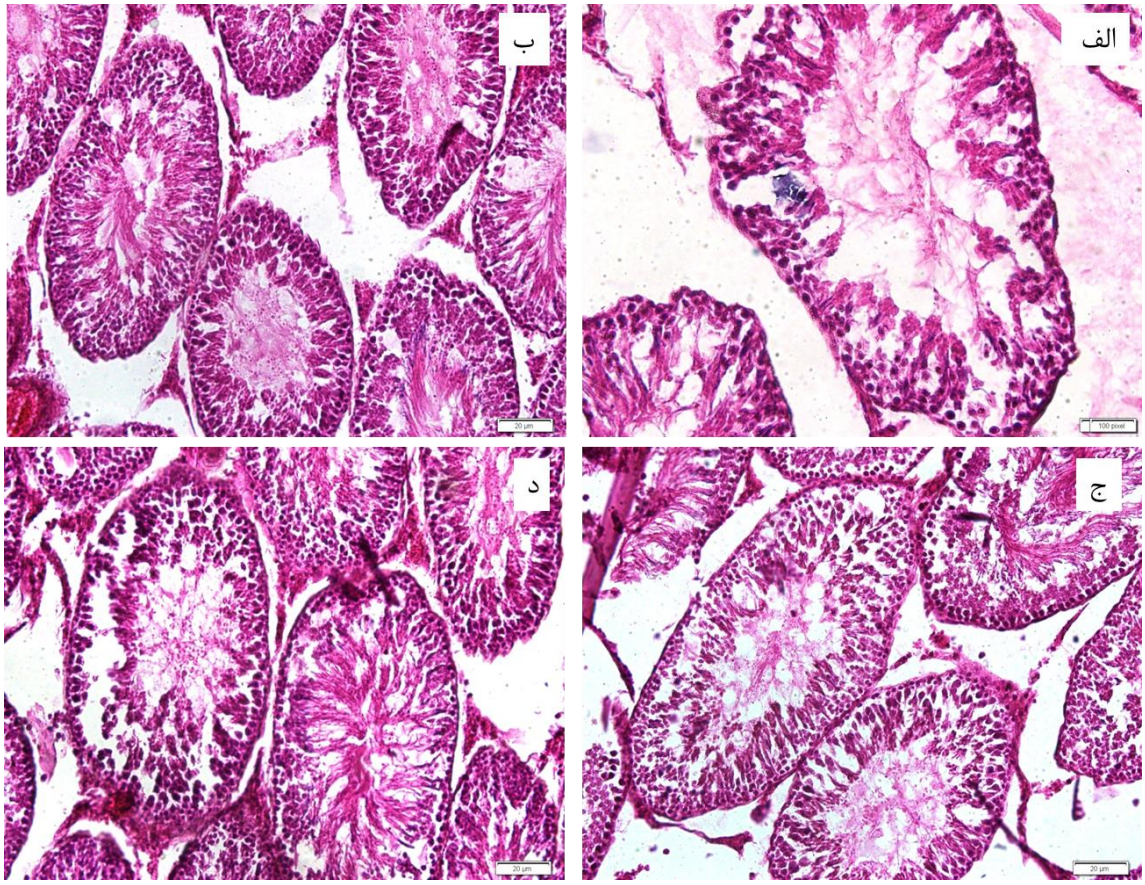
گروه کنترل با گروه‌های بوسولفان (P<۰/۰۰۱)، غلظت ۱۰٪ (P=۰/۰۱۰) و غلظت ۵٪(P=۰/۰۰۷) عصاره خرفه اختلاف معنی‌داری از نظر میانگین فعالیت آنزیم SOD نشان داد. میانگین فعالیت آنزیم SOD در گروه بوسولفان با گروه غلظت ۱۰٪(P=۰/۰۰۲) و غلظت ۵٪ (P=۰/۰۰۳) عصاره خرفه اختلاف معنی داری نشان دادند (شکل ۱ ه).

گروه کنترل با گروه‌های بوسولفان (P<۰/۰۰۱)، غلظت ۱۰٪ (P=۰/۰۵)، و غلظت ۵٪(P=۰/۰۳۳) عصاره خرفه اختلاف معنی‌داری از نظر میانگین فعالیت آنزیم MDA نشان داد. میانگین فعالیت آنزیم MDA در گروه بوسولفان با گروه غلظت ۱۰٪(P<۰/۰۰۱) و غلظت ۵٪ عصاره خرفه (P<۰/۰۰۱) اختلاف معنی‌داری نشان دادند (شکل ۱و).



شکل ۱– درصد اسپرم‌های متحرک (الف) ، درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیش رونده (ب)، درصد اسپرم‌های زنده (ج) میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز بافتی (د)، میانگین فعالیت آنزیم SOD بافتی (ه) میانگین میزان MDA بافتی (و)
a, b, c حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۵) (غلظت ۱= ۵٪ عصاره خرفه) غلظت ۲= ۱۰٪عصاره خرفه)

در گروه‌های مختلف امتیازدهی جانسون با مقاطع هیستوپاتولوژی محاسبه گردید (شکل ۲ و جدول ۱).



شکل۲- مقاطع هیستوپاتولوژی از گروه های بوسولفان (الف) با میانگین امتیازدهی تقریبا ۴ ، کنترل (ب) با میانگین امتیازدهی ۹ ، غلظت ۱ (ج) با میانگین امتیازدهی در حدود ۶ و غلظت ۲ (د) میانگین امتیازدهی حدودی ۶.

جدول ۱- میانگین امتیازدهی جانسون در گروه‌های مختلف

گروه	میانگین	انحراف استاندارد
کنترل	۸/۸^{a}	۰/۸۴
غلظت ۵ درصد خرفه	۵/۸^{b}	۰/۴۴
غلظت ۱۰ درصد خرفه	۶/۲^{b}	۰/۸۳
بوسولفان	۳/۴^{c}	۰/۵۴

^{a,b,c}حروف نامتشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح (P<۰/۰۵) است.

بحث

در این مطالعه اثر محافظتی گیاه خرفه در برابر آسیب‌های توکسیک بوسولفان بر برخی شاخص‌های اسپرمی از طریق تاثیر بر وضعیت استرس اکسیداتیو در مدل حیوانی ارزیابی شد. بوسولفان، به عنوان یک داروی ضد سرطان و پیوند عضو به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. استفاده ازترکیبات دارویی با منشأ گیاهی همواره برای درمان بیماری‌ها قابل توجه پژوهشگران بوده‌است. دلیل اصلی تمایل پژوهشگران به استفاده ازترکیبات گیاهی، عوارض جانبی پایین این داروها نسبت به داروهای شیمیایی است که طی سال‌ها مصرف درطب سنتی به اثبات رسیده‌است (۱۳). یکی از رایج‌ترین گیاهان دارویی موجود، گیاه خرفه است که قابل توجه قرار گرفته است

(۱۹). خرفه گیاهی است که به طور طبیعی در مکان‌های مختلف یافت می‌شود و یکی از رایج‌ترین گیاهان در جهان است (۲). پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهد که خرفه دارای کیفیت تغذیه‌ای بهتری نسبت به سبزیجات عمده کشت شده، با بتاکاروتن، اسید اسکوربیک و اسید آلفا لینولنیک است (۱۲). همانند گزارش‌های قبلی با توجه به نتایج اسپرماتوگرام در گروه بوسولفان مشخص گردید که این دارو در اسپرماتوژنز ایجاد اختلال می‌کند و با توجه به نتایج فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و میزان MDA در این گروه مشخص شد که این دارو سبب القای استرس اکسیداتیو و احیانا ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال می‌شود و از این طریق سبب کاهش شاخص‌های اسپرم و ناباروری می‌گردد (۲۰). از اثرات جانبی بوسولفان ناباروری ناشی از تخلیه و حذف سلول‌های زایا به دلیل آپوپتوز شدید در سلول‌های اسپرماتوگونی به علت آسیب به DNA است (۶). این آسیب‌ها در نهایت هم سبب کاهش عملکرد اسپرم و هم کاهش اسپرماتوژنز می‌شود (۲۰ و ۲۶) که در مطالعه حاضر با توجه به نتایج اسپرماتوگرام اثرات سوء بوسولفان براسپرماتوژنز اثبات شد؛ اگرچه اثر خرفه روی فعالیت آنزیمی کاتالاز نسبت به گروه بوسولفان تفاوتی نداشت، مهم‌ترین یافته این مطالعه افزایش فعالیت آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز و کاهش میزان مالون دی‌آلدئید در هر دو غلظت ۵ و ۱۰ عصاره گیاه خرفه درصد نسبت به گروه بوسولفان و کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و افزایش میزان مالون دی‌آلدئید در این گروه‌ها نسبت به گروه کنترل بود این نشان می دهد؛ اگرچه این دو غلظت استفاده شده از عصاره گیاه خرفه توانسته اثرات استرس اکسیداتیو بوسولفان را کاهش دهد، ولی این اثرات به طور کامل از بین نرفته‌اند. این نتایج منطبق بر نتایج هیستوپاتولوژی بود که در آن نتایج اسکور جانسون نیز در گروه درمانی در هر دو غلظت نسبت به گروه بوسولفان بالاتر و نسبت به گروه کنترل پایین‌تر بود، همچنین این نتایج نشان داد که اثرات محافظتی گیاه خرفه روی دستگاه تولید مثلی رت نر ممکن است از طریق جلوگیری از اکسیداسیون اسیدهای چرب القایی از طریق بوسولفان با افزایش فعالیت آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز (نه کاتالاز) باشد. استفاده از آنتی اکسیدان‌های مختلف مانند ال‌کارنیتین، اتروواستاتین و ملاتونین به صورتی تکی و تجویز هم‌زمان و اثرات محافظتی این عوامل در برابر شرایط استرس اکسیداتیو از سوی Zangoie و همکاران دردستگاه‌های تولیدمثلی رت نر گزارش شده است (۲۶)، همچنین Salehinezhad و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان دادند که آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند ال‌کارنیتین، اتروواستاتین و ملاتونین به صورتی تکی و تجویز هم‌زمان می توانند سبب کاهش بیان ژن‌های آپوپتوتیک و افزایش بیان ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک در بیضه رت‌های نر در مواجهه با دوزهای مختلف بوسولفان شوند (۲۰). اخیرا گزارش شده است که در رت‌های ماده نژاد ویستار متعاقب تحویز عصاره هیدروالکی خرفه اختلالاتی در سیکل استروس ایجاد شده و منجر به اثرات ضد باروری در جنس ماده می‌شود؛ اگرچه در این مطالعه اثرات به صورت افزایش و کاهش غیر معنی‌داری گزارش شده است که از نظر علمی اشتباه است (۱۵)؛ دلیل دیگر این اختلاف نتایج استفاده از دوز بالای گیاه خرفه است. گیاه خرفه اثراتی روی دستگاه تولید مثلی به‌خصوص در حیوانات نر دارد. برخلاف یافته این مطالعه،گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد گیاه خرفه سبب کاهش حرکت اسپرم، کاهش تستوسترون (۱۴)، کاهش شاخص‌های اسپرمی و تاثیر نامطلوب بر ساختار اسپرم می‌شود (۱۶). اختلاف نتایج مطالعات قبلی با مطالعه حاضر، شرایط متفاوت مطالعه بود به طوری که مطالعه حاضر در شرایط استرس اکسیداتیو و مطالعه‌ی مذکور در شرایط نرمال انجام شده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد، گیاه خرفه بدون وابستگی به غلظت، می‌تواند اثرات توکسیک ناشی از بوسولفان در دستگاه تولید مثلی نر و اسپرماتوژنز را از طریق کاهش اکسیداسیون اسیدهای چرب غشا و افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کاهش دهد.

منابع

1- Abedi, Z.H; McKinley, W. P; Bioassay of captan by zebra fish larvae. Nature; 1967; 216: 1321-1322.
2- Ahangarpour, A; Lamoochi, Z; Moghaddam ,H; Mansouri, S; Effects of Portulaca oleracea ethanolic extract on reproductive system of aging female mice. Int J Reprod Biomed; 2016; 14:205–212.
3- Asharani, P .V; Wu, Y. L; Gong, Z; Valiyaveettil, S; Toxicity of silver

nanoparticles in zebra fish models. Nanotechnology; 2008; 19:102-225.
4- Berman, J. K; Hsu ,T; Zebrafish as a model organism for blood diseases. British Journal of Haematology; 2003; 123: 568–576.
5- Bopp, S. K; Minuzzo, M; Lettieri ,T; The Zebrafish (Danio rerio): an Emerging Model Organism in the Environmental Field. Institute for Environment and Sustainability;2006;1-24.
6- Choi Y.J;Ok, D.W;Kwon; D.N;Chung, J.I;Kim ,H.C;Yeo, S.M;Kim, T;Seo, H.G;Kim, J.H; Murine male germ cell apoptosis induced by busulfan treatment correlates with loss of c-kit-expression in a Fas/FasL- and p53-independent manner. FEBS Lett;2004;575:41-51.
7- Dahm, R; Geisler, R, Volhard, C ; Zebrafish (Danio rerio) Genome and Genetics. Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine; 2005; 15: 593-629.
8- DeFilipp, Z; Li, S; El-Jawahri, A; Armand, P; Nayak, L; Wang, N; Batchelor, T.T; Chen, Y.B; High-dose chemotherapy with thiotepa, busulfan, and cyclophosphamide and autologous stem cell transplantation for patients with primary central nervous system lymphoma in first complete remission. Cancer; 2017; 123:3073-9.
9- Engeszer, R.E; Patterson, L.B; Rao, A.A; Parichy, D.M; Zebra fish in wild: A review of natural history and new notes from the field. ZEBRA FISH; 2007; 4: 21- 37.
10- Isogani, S; Horiguchi, M; Weinstain, B.M; The vascular anatomy of the developing zebra fish: An atlas of emberionic and early larval devepement. Developemental Biology (IDEAL); 2001; 230: 278- 301.
11- Kaleuff ,A. V; Gebhardt,M; Stevart, A.M; Cachet, J.M; Brimmer, M; Chawala, J.S et al; The Zebra fish Neuroscience Research Consortium (ZNRC): Towards a comprehensive catalog of zebra fish behavior 1.0 and beyond. ZEBRA FISH;2013;10:70-86.
12- Liu, L; Howe, P; Zho, Y; Xu, Z; Hocart, C; Zhang, R; Fatty acids and β-carotene in Australian purslane (Portulaca oleracea) varieties. J Chromatogr A ;2000; 893:207–213
13- Nasri, H; Shirzad H, Baradaran A, Rafieian M. Antioxidant plants and diabetes mellitus. J Isfahan Univ Med Sci ;2015;20:491–502.
14- Obinna, V; Kagbo, H and Agu, G; Effects of Lipophilic and Hydrophilic leaf extracts of Portulaca oleracea Linn. (Purslane) on male reproductive parameters in albino rats. Am J Physiol Biochem Pharmacol; 2019; 9:21–32.
15- Okafor, I.A; Nnamah, U.S. and Nnaka, J; The fertility assessment of normal cyclic Wistar rats following the administration of methanolic extract of Portulaca oleracea: an experimental study. Middle East Fertility Society Journal; 2021;26:1-0.
16- Oyedeji, K.O. and Bolarinwa, A.F; Effect of extracts of Portulaca oleracea L. on reproductive functions in male albino rats. Afr J Biomed Res; 2010; 15:41–47.
17- Panahi, M; Keshavarz, S; Rahmanifar, F; Tamadon, A; Mehrabani, D; Karimaghai, N; Sepehrimanesh, M; Aqababa, H; Busulfan induced azoospermia: Stereological evaluation of testes in rat. Vet Res Forum; 2015; 6:273-8.
18- Rasooly, R.S; Henken, D; Freeman, N; Tompkins,L; Badman, D; Briggs J, Hewitt A. The Genetic and genomic tools for zebra fish research: The NIH zebra fish initiative. Developmental Dynamics;2003;228:490- 496.
19- Sabeeha, S. and Nahida ,T; Study of ethanolic extract of Portulaca oleracea (whole plant) on blood glucose levels and body weight in streptozotocin induced diabetic rats. Int Res J Pharmacol;2018;9:71–76.
20- Salehinezhad, F; Eshraghi, H; Kadivar, A; Shirian, S; Asghari, A; Aali; E; Davoodian, N; Amelioration effects of vitamin E, melatonin, L-carnitine, and atorvastatin, on destructive effects of busulfan in the testes of male rats: A gene expression evaluation. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi; 2019; May 6.
21- Sattari ,M; Ichthyology 3.(Ecology and animal geography of fish, Haghshenas publications; 2008; 334-44.[In Persian]
22- Spence, R; Gerlach, G; Lawrence, C; Smith, C; The behavior and ecology of the zebra fish, Danio rerio. Biological Reviews; 2008; 83: 13-34.
23- Spence, R; Gerlach, G, Lawrence. C; Smith C; The behavioral and ecology of the zebra fish, Danio rerio. Biological Reviews; 2008; 10: 1-36 55 .
24- Streisinger, G; Walker, C; Dower, N; Knauber, D; Singer, F; Production of clones of homozygous diploid zebra fish (Brachydanio rerio), Nature; 1981; 297: 6-293.
25- Wang, D.Z; Zhou, X.H; Yuan, Y.L; Zheng, X.M; Optimal dose of busulfan for depleting testicular germ cells of recipient mice before spermatogonial transplantation. Asian J Androl; 2010;12:263-70.
26- Zangoie, R; Eshraghi, H; Shirian, S; Kadivar, A; Nazari, H; Aali, E;Melatoninsynergistically enhances protective effect of atorvastatin against busulfan-induced spermatogenesis injuries in a rat model .Comparative Clinical Pathology; 2019; 29:161-166.

Vol.16/No.2
Fall-Winter 2022/2023

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2023; 16(2): 9-16.
http://doi.org/ 10.22034/ijvcs.2022.10192.1009

The Protective Effect of *Portulaca Oleracea* on Toxic Damages Induced by Busulfan in Reproductive System in a Male Rat Model

Forutan Salehinezhad[1]; Seyedeh Ommolbanin ghasemian[1*]

1. Department of Veterinary, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan- Iran.

Received: 17 January 2022 ***Accepted:*** 3 October 2022

Summary

The aim of this study was to evaluate the antioxidant and protective effects of *portulaca oleracea* extract on toxic damage induced by busulfan administration on some spermatic parameters in the male rat reproductive system. 40 adult male Wistar rats weighing 250-280 g were randomly divided into 4 groups of 10 as following the groups receiving busulfan, busulfan + 5% *portulaca oleracea* extract, busulfan + 10% *portulaca oleracea* and control.Mean sperm parameters such as percentage of live, motile and progressive sperm in each group were compared.The activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase enzymes, and malondialdehyde (MDA) and total protein levels and histology in the rat testes were evaluated and compared. The mean of all three sperm parameters decreased significantly in the busulfan group compared to all groups ($P<0.05$). The highest levels of MDA and the lowest activity of SOD belonged to busulfan group followed by both concentrations and control groups ($P<0.05$). The activity of catalase enzyme in Busulfan groups and both concentrations of *portulaca oleracea* did not differ significantly ($P>0.05$), and the control group showed the highest activity of catalase in comparison with other groups ($P<0.05$). The results of histopathology also showed higher scores in both treatment groups than the busulfan group and it's lower than the control group ($P<0.05$). The results showed that *portulaca oleracea* regardless to concentration could reduce the toxic effects of busulfan in a reproductive system and spermatogenesis by reducing the oxidation of membrane fatty acids and increasing the activity of SOD enzyme.

Keywords: Busulfan, portulaca oleracea, Catalase, MDA, Superoxide Dismutase, sperm parameters

***Corresponding author:** Ghasemian1249@yahoo.com