[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.2.167]

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:49 IRST on Saturday February 27th 2021

اثر ریشه کودزو بر فعالیت Caspease-3 به روش ایمنو هیستوشیمی در بافت بیضه در موش های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

منیره شهسواری[۱]، پیراسته نوروزی[۲]، حمید کلالیان مقدم*[۲]، ویدا حجتی[۱]

۱) گروه زیست شناسی ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران

۲) گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۳

چکیده

مقدمه: آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلول نقش مهمی در پاتوژنز بیماری های متعدد ایفا می کند. دیابت ملیتوس عوارض مخربی بر دستگاه تولید مثلی نر و عملکرد جنسی در نمونه های حیوانی و انسانی مبتلا به دیابت اعمال می کند و باعث افزایش آپوپتوز می شود. ریشه کودزو یک ساپونین و ایزو فلاونین می باشد که اغلب به عنوان عامل کاهنده قندخون مورد استفاده قرار می گیرد. کودزو توانایی کاهش گلوکز خون از مسیر غیر وابسته به انسولین را داشته و هم چنین با حذف رادیکال های آزاد منجر به کاهش استرس اکسیداتیو می گردد. مطالعه اخیر تاثیر ریشه کودزو بر فعالیت Caspease-3 به روش ایمنوهیستوشیمی در بافت بیضه در موش های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین بررسی گردید.

مواد و روش ها: موش های نر نژاد ویستار به چهار گروه تقسیم شدند: کنترل، دیابتی، دیابتی تیمار شده با کودزو ۱۰۰mg/kg، دیابتی تیمار شده با کودزو ۵۰mg/kg. دیابت به وسیله تزریق درون صفاقی STZ(با دوز ۵۰mg/kg) ایجاد گردید. تیمار با کودزو با دوز ۵۰mg/kg و ۱۰۰ به مدت پنج هفته به صورت گاواژ انجام شد. آسیب های بیضه ای به وسیله روش رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی و هماتوکسیلین-ائوزین مشخص شده و فاکتورهای بیوشیمیایی و هورمونی خون مورد سنجش قرار گرفت.

یافته های پژوهش: موش های دیابتی افزایش معنی داری را در آپوپتوز بافت بیضه نشان دادند. موش های دیابتی به طور مشخص کاهش در قطر توبول سمینی فروس، سلول های سرتولی، شمارش و تحرک اسپرم و مقدار تستوسترون و انسولین نشان دادند. در رت های تیمار شده با ریشه کودزو منجر به کاهش معنی دار سلول های دچار آپوپتوز در موش های دیابتی گردید و به طور مشخص سبب افزایش وزن بدن و میزان انسولین و تستوسترون پلاسما و کاهش مقدار گلوکز گردید. هم چنین تجویز خوراکی ریشه کودزو افزایش در تعداد و تحرک اسپرم، سلول های رده اسپرم ساز و سلول سرتولی مشاهده گردید.

بحث و نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه، وقوع آپوپتوز را در دیابت مورد تائید قرار داده و اثرات آنتی آپوپتوزی ریشه کودزو را خاطر نشان می سازد.

واژه های کلیدی: دیابت، ریشه کودزو، اسپرماتوژنز، آپوپتوز، موش

*نویسنده مسئول: گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.2.167]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:49 IRST on Saturday February 27th 2021

مقدمه

دیابت ناشی از اختلال در متابولیسم کربوهیدرات ها، چربی ها و پروتئین ها است که بر اثر فقدان ترشح انسولین یا کاهش حساسیت بافت ها به انسولین ایجاد می شود(۱). این بیماری عوارض حاد و مزمن بسیاری بر اندام های مختلف دارد و اختلالاتی چون نوروپاتی(۲)، نفروپاتی(۳) و رتینوپاتی(۴)، اختلال در رفتارهای جنسی و بافت تولیدمثلی(۵) ایجاد می کند. این عوارض در بافت تولیدمثلی جنس نر به صورت کاهش تعداد اسپرم(۶)، کیفیت پایین مایع سمینال(۷)، کاهش هورمون تستوسترون(۸) و کاهش سلول های رده اسپرم ساز(۹) بروز می نماید. علاوه بر این بیضه ها به عوامل محیطی القاء کننده مرگ سلولی نیز حساس بوده و آپوپتوز سلول های ژرمینال نیز در طی استرس های غیر فیزیولوژیک نظیر: ایسکمی، افزایش دما، تشعشع و دیابت ممکن است ایجاد گردد(۱۰). آسیب های اکسیداتیو وارده به بافت بیضه منجربه تغییرات بیوشیمیایی و هورمونی می شود و متعاقب آن میل جنسی و رفتارهای جنسی کاهش می یابد(۵) و بافت های تولیدمثلی نیز متحمل آسیب می شوند.

افزایش قندخون از چند مسیر جداگانه استرس اکسیداتیو را القاء می نماید. از جمله می توان عدم تعادل اکسیداسیون و احیاء، افزایش فعالیت آلدوز ردوکتاز(۱۳)، افزایش محصولات نهایی گلیکوزیلاسیون (۱۴)، تغییر در فعالیت پروتئین کیناز C، بر هم زدن تعادل پروستانوئیدها(۱۵) و افزایش تولید سوپراکسیدهای میتوکندریایی را نام برد(۱۶). عوامل ایجادکننده استرس اکسیداتیو در واقع باعث عدم توازن محصولات رادیکالی آزاد و مکانیسم های دفاعی آنتی اکسیدان گردیده و آسیب های بافتی بالقوه ای را در بافت های مختلف ایجاد می نمایند. استفاده از درمان های جایگزین خصوصاً، درمان های گیاهی به طور فزاینده ای مورد توجه قرار گرفته است. گیاهان دارویی و مشتقات آن ها از دیر باز به دلیل داشتن مقادیر قابل توجهی از آنتی اکسیدان های طبیعی در درمان دیابت قندی و عوارض آن مورد استفاده قرار گرفته اند(۳۲) و از طرفی کم عارضه بودن، کم هزینه و سهل الوصول بودن باعث گرایش به آن ها شده است(۳۳،۳۴).

کودزو متعلق به خانواده فابسه آ است زیر خانواده پاپیلو نئودیا از تیره فاسولیا زیر تیره گلی سینا و جنس پورریا می باشد. کودزو سرشار از ترکیبات پلی فنولیک است که شامل ایزو فلاون ها، ایزو فلاون های گلیکوزیدی، کومارین ها، پوراروز، ۲ بوتیل اینولیدها و مشتقاتشان. در ۶۰۰ سال پس از میلاد این به عنوان یک ضد الکل برای کسانی که مشکلات مصرف الکل داشتند توصیه شده بود(۱۷). طبیعت کودزو سرد و مزه ای شیرین دارد و مورد مصرف آن در شادابی کبد، قطع اسهال و تقویت تولید مایعات بدن است(۱۸). بر اساس فارماکوپه جمهوری خلق چین گیاه خشک شده Puerariae Radix ضد تب، اسهال خونی حاد، تشنگی، دیابت و فشارخون می باشد. مطالعات اخیر نشان داده است که متانول یا آب استخراج شده از گلهای کودزو حاوی اثرات پایین آورنده قندخون، چربی و به عنوان یک آنتی اکسیدان محافظ سلول های کبد، ضد جنون، تاثیرات استروژنی و ضد سرطان می باشد. کودزو اثرات مشخصی را با متابولیسم چربی و کربوهیدرات نشان داده است. مطالعات قبل و بعد از تشخیص بیماری نشان داده است کودزو اثرات بسیاری بر هومئوستاز گلوکز دارد.

مواد و روش ها

موش های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۴۰-۲۲۰ گرم از بخش حیوانات انستیتو پاستور آمل تهیه گردیدند. سن حیوانات در هنگام انجام آزمایش یک تا یک و نیم ماه بود. حیوانات در شرایط کنترل شده از نظر نور(۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و دمای محیط ۲۴-۲۰ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۶۰-۴۰ درصد در اتاق حیوان خانه مرکز آموزش عالی علمی کاربردی رسول اکرم(ص) دامغان نگهداری شدند تا با محیط جدید سازگار شوند. این شرایط طی آزمایش نیز حفظ گردید. در طول مطالعه جهت تغذیه آن ها از غذای مخصوص موش(غذای فشرده) و آب آشامیدنی شهری در داخل ظروف آب خوری مخصوص استفاده گردید و حیوانات به طور آزادانه به آب و غذای کافی دسترسی داشتند. موش ها

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.2.167]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:49 IRST on Saturday February 27th 2021

به طور تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی کنترل، دیابتی، دیابتی تیمار شده با کودزو ۱۰۰mg/kg، دیابتی تیمار شده با کودزو ۵۰mg/kg تقسیم شدند.

داروهای به کار رفته در این آزمایش شامل ریشه کودزو(SC-۲۰۵۷۸۸) و استرپتوزوتوسین(S0۱۳۰) بودند، که ریشه کودزو از شرکت سانتاکروز بیوتکنولوژی آمریکا و استرپتوزوتوسین(STZ) از شرکت سیگما خریداری شد. القای دیابتی با تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین(۵۵mg/kg) حل شده در بافر سیترات(۰/۰۵ مولار با PH=۴/۵) دیابتی شدند. جهت حصول اطمینان از دیابتی شدن موش ها ۷۲ ساعت بعد از تزریق STZ، سنجش قندخون با استفاده از خون سیاهرگ دمی و به کمک دستگاه Glucoard 01 انجام شد و موش های صحرایی دارای قندخون بالاتر از ۳۰۰mg/dl به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند. موش ها در گروه کنترل تحت هیچ تیماری قرار نگرفتند. گروه سوم و چهارم یک هفته پس از القای دیابت، داروی کدزو روزانه متناسب با وزن هر موش با دوز ۵۰mg/kg و ۱۰۰ در آب مقطر حل شده به صورت دهانی(گاواج) به حیوان خورانده شد. با نمونه گیری از سیاهرگ دمی میزان قندخون در هفته های ۱، ۳، ۵ و ۷ پس از تزریق استرپتوزوتوسین سنجش شد.

در انتهای دوره با تزریق مواد هوش بری کتامین و دیازپام به صورت درون صفاقی بی هوش شدند و خون مستقیماً از قلب آن ها گرفته شد. بیضه ها برای بررسی بافتی و شمارش اسپرم خارج شدند. در هر نمونه بیضه راست دورن فرمالین ۱۰ درصد جهت آماده سازی برای مطالعات بافتی قرار گرفته و بیضه چپ برای بررسی های مورفومتری مورد استفاده قرار گرفت، به این ترتیب که، ابتدا توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شد. طول و قطر آن به وسیله کولیس اندازه گیری شد، سپس با کمک استوانه مدرج حجم بیضه محاسبه گردید. مراحل آماده سازی بیضه ها جهت تهیه مقاطع بافتی که شامل: تثبیت کردن بافت(محلول بوئن)، آب گیری از بافت(اتانول)، شفاف کردن(گزیلول)، نفوذ پارافین، قالب گیری، مقطع گیری(برش گیری)، رنگ آمیزی(H&E) و برای روش ایمونوهیستوشیمی قرار گرفتن مقاطع پارافینی بعد از برش روی لام سیلانه، بلاک کردن پراکسیداز(محلول ۱۰ درصد H2O2/Methanol)، بلاک کردن آنتی ژن(BSA (bovine serum albumin، آنتی بادی اولیه، آنتی بادی ثانویه HRP (Goat Polyclonal secondary antibody)، انکوبه کردن با کروموژن(DAB Substrate ۱ درصد)، counter stain در هماتوکسیلین، اتانول، گزیلول، مونته کردن.

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت و برای مقایسه بین گروه ها ازآنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی انجام گرفت مرز استنتاج آماری نتایج($P<0.05$) در نظر گرفته شد. نمودار آپوپتوز با نرم افزار آماری prism 5.0 و آزمون های Tukey,one way ANOVA تجزیه تحلیل شد.

یافته های پژوهش

حیوانات دیابتی به عوارض متعدد ناشی از دیابت شامل: پرخوری، پرنوشی و اسهال مبتلا شدند. اندازه گیری وزن موش ها از هفته سوم کاهش معناداری در گروه دیابتی و دیابتی تیمار با دارو نسبت به گروه کنترل نشان می دهد. گروه کنترل(۳۱۲/۴±۳/۳۶۲)، گروه دیابتی(۱۷۹/۵±۱۰/۵۰)، گروه دیابتی تیمار با دارو ۱۰۰mg/kg(۲۴۸/۴±۰/۵۳۴ گرم) و گروه دیابتی تیمار با دارو ۵۰ mg/kg(۲۱۷/۲±۰/۴۱۲ گرم)($P<0.001$).

در ارزیابی میزان قندخون، گروه دیابتی تیمار با دارو ۱۰۰ mg/kg(۳۱۴/۵±۳۷/۲۴) و گروه دیابتی تیمار با دارو ۵۰ mg/kg(۳۷۶/۵±۴۴/۸۸) از هفته سوم به بعد، کاهش معناداری نسبت به گروه دیابتی(۴۹۵/۵±۲۵/۵۶) نشان داد($P<0.05$)(نمودار شماره ۱)

نتایج مقایسه تغییرات مورفولوژیک بیضه ها در گروه های مختلف نشان می دهد که دیابت سبب کاهش معناداری در حجم و وزن بیضه ها در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل داشته است($P<0.001$). در گروه های درمانی وزن و حجم بیضه نسبت به گروه دیابتی افزایش داشته است($P<0.001$). ارزیابی بافت شناسی بافت بیضه ها نشان می دهد که ساختار بافتی در نمونه های دیابتی تخریب شده است و کاهش قابل توجهی در مجموعه های سلولی نسبت به گروه کنترل

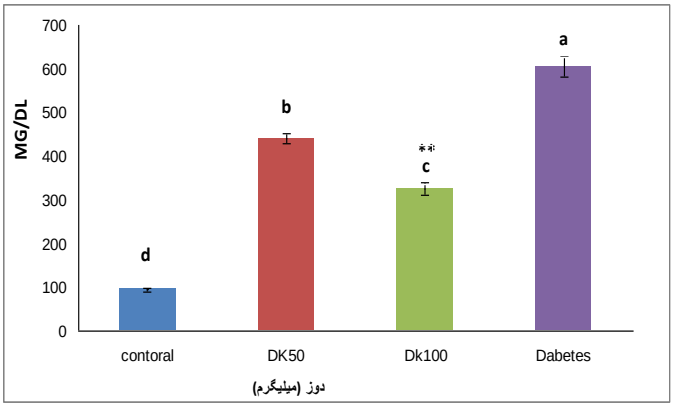
[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.2.167]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:49 IRST on Saturday February 27th 2021

وجود داشت. هم چنین در گروه های درمانی با کودزو در مقایسه با گروه دیابتی، تعداد سلول های اسپرماتوژنیک به طور چشمگیری افزایش یافته و در ساختار لوله اسپرم ساز نیز آثار بهبودی مشاهده می شود(شکل شماره ۱).

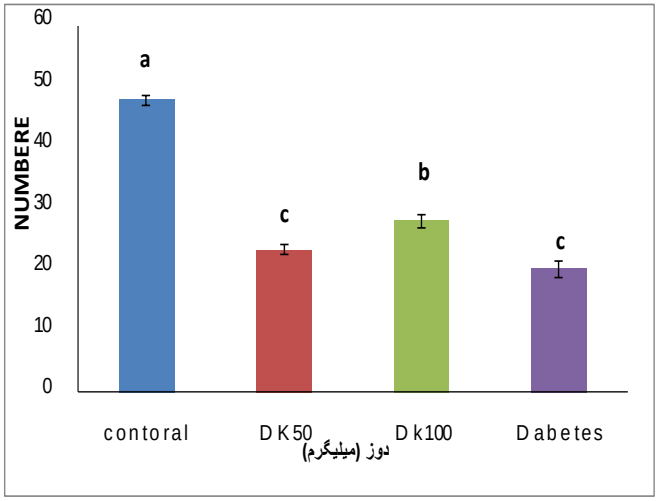
تعداد سلول های سرتولی در گروه دیابتی، نسبت به گروه کنترل و گروه های تیمار شده با کودزو به طور معناداری کاهش یافته است با توجه به مجموع تغییرات ذکر شده لوله های اسپرم ساز در نمونه های دیابتی به شدت آتروفی شده، ولی در نمونه های تیمار شده میزان این آسیب ها کاهش یافته است. مقایسه تعداد و تحرک اسپرم بین گروه کنترل و گروه های تیمار شده نشان می دهد که دیابت سبب کاهش معنی دار نسبت به گروه کنترل شده است($P\leq0.01$) در گروه های درمانی تعداد اسپرم نسبت به گروه دیابتی افزایش یافته اما معنی دار نیست(نمودار شماره ۲).

میزان انسولین و تستوسترون سرم در تمام گروه های دیابتی تسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافت. هم چنین گروه های تیمار با دارو (۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم) در مقایسه با گروه دیابتی تفاوت معنی داری را نشان دادند($P<0.001$)(نمودار شماره ۵).

میزان آپوپتوز در گروه دیابتی و گروه های تیمار شده با کودزو نسبت به گروه کنترل به طور معناداری افزایش یافته است($P<0.001$). هم چنین در گروه های درمانی با کودزو در مقایسه با گروه دیابتی میزان آپوپتوز کاهش یافته است($P\leq0.01$).

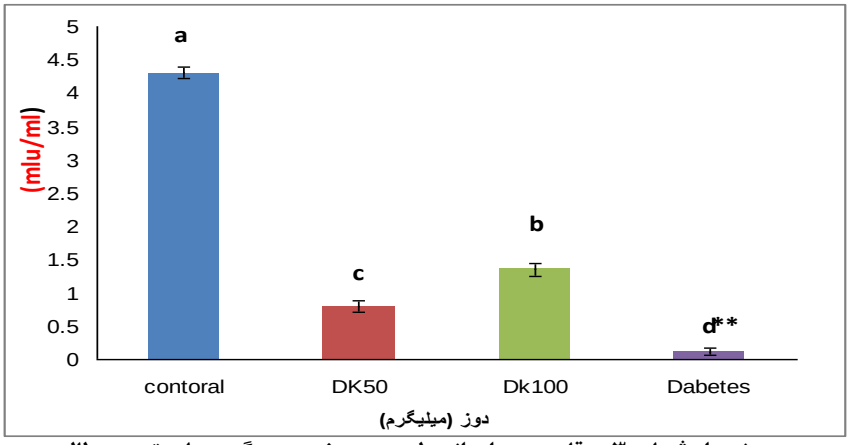


نمودار شماره ۱. مقایسه قندخون موش ها در هفته اول، هفته سوم، پنجم و هفتم بین گروه های تحت مطالعه

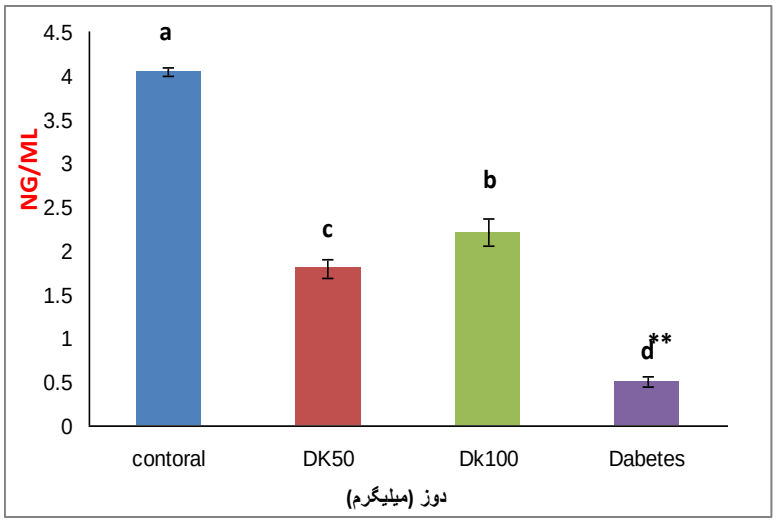


نمودار شماره ۲. مقایسه تعداد اسپرم بین گروه های تحت مطالعه

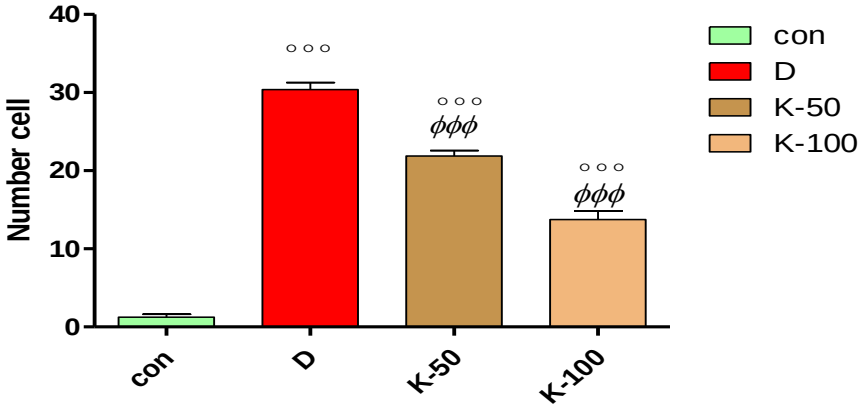
[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.2.167]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:49 IRST on Saturday February 27th 2021



نمودار شماره ۳ . مقایسه میزان انسولین سرم خون بین گروه های تحت مطالعه



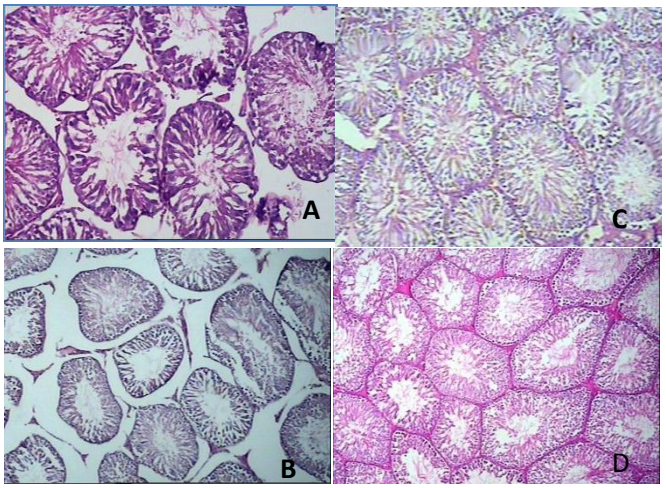
نمودار شماره ٤. میزان هورمون تستوسترون سرم خون بین گروه های تحت مطالعه



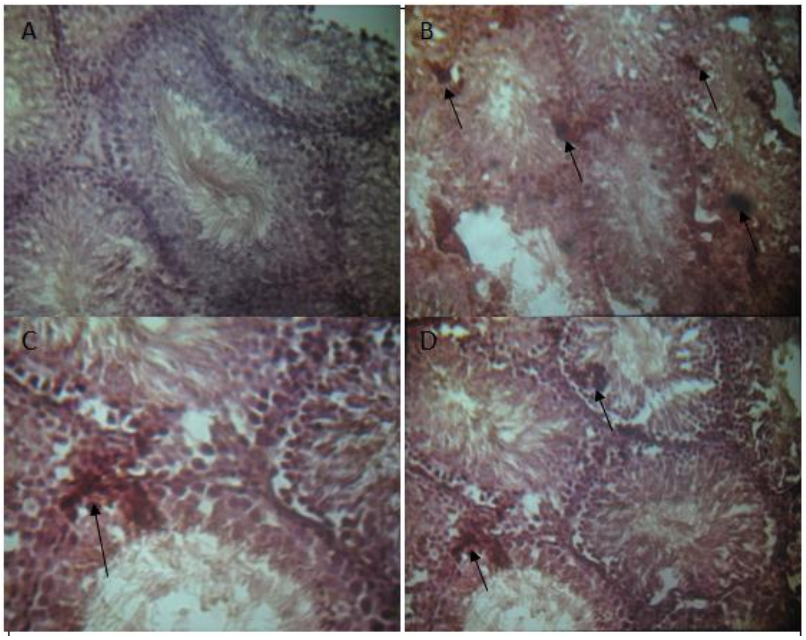
نمودار شماره ۵. میزان آپوپتوز بین گروه های تحت مطالعه

ooo تفاوت معنی دار با گروه کنترل، (P<0.001)، ***تفاوت معنی دار با گروه دیابتی(P<0.001)

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.2.167]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:49 IRST on Saturday February 27th 2021



شکل شماره ۱. فتومیکروگراف برش عرضی لوله های اسپرم ساز و سلول سرتولی. A: کنترل، B: دیابتی، چروکیده شدن توبول ها، افزایش فضای بینابینی، کاهش شدید تعداد سلول های زاینده، C: دیابتی تیمار شده با کودزو(۵۰mg/kg)، افزایش قطر توبولی نسبت به دیابتی، کاهش فضای بینابینی، افزایش تعداد سلول های زاینده، D: دیابتی تیمار شده با کودزو (۱۰۰mg/kg)، افزایش قطر توبولی، کاهش فضای بینابینی، افزایش قابل توجه تعداد سلول های زاینده



شکل شماره ۲. تصویر میکروسکوپی از برش های بافت بیضه که با روش ایمنو هیستوشیمی برای Caspease-3رنگ آمیزی شده اند(بزرگ نمایی 400 X). A: کنترل، B: دیابت، C: دیابتی دریافت کننده کدزو ۱۰۰ mg/kg، D: دیابتی دریافت کننده کدزو ۵۰mg/kg. پیکان ها نشان دهنده سلول های Caspase-3 مثبت می باشد.

بحث و نتیجه گیری

کاسپازها جزء خانواده سیستئین پروتئاز هستند که نقش محوری در شروع و فاز اجرایی آپوپتوز ایفا می نمایند .به دنبال فعال شدن، این آنزیم ها روی سوبستراهای خاصی عمل و تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیک در سلول آپوپتوتیک ایجاد می نمایند. از جمله چروک شدن سلول، متراکم شدن کروماتین، قطعه قطعه شدن DNA و... بنا بر این ارزیابی فعالیت

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.2.167]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:49 IRST on Saturday February 27th 2021

کاسپاز به عنوان یک مارکر بیوشیمیایی آپوپتوز مطرح است(۳۵).

کاسپازها را بر اساس ساختار، ویژگی نسبت به سوبسترا، فعالیت فیزیولوژیک و اندازه پرودمین پروکاسپاز، تقسیم بندی می نمایند. اما چیزی که در آپوپتوز بیشتر حائز اهمیت است تقسیم بندی کاسپازها به دو گروه کاسپازهای آغازگر کاسپاز(۸،۹،۱۰،۱۲) و کاسپازهای اجرایی(۳،۶،۷) می باشند(۳۶). فعال شدن کاسپاز به میزان زیادی، مختص آپوپتوز است و تعیین فعالیت کاسپازها برای تمایز بین نکروز و آپوپتوز می تواند مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر نقش و اهمیت کاسپازها در فرآیند آپوپتوز، کاسپازها در فرآیند تکامل، تمایز و التهاب نیز دخالت دارند(۳۷).

در شرایط طبیعی، سلول ها با نگه داشتن کاسپازها به فرم غیر فعال، از خودشـان در برابـر مرگ آپوپتوزی محافظت می کنند. در صورت دریافت پیام مرگ، برخی کاسپازها بـا هضـم پروتئولیتیکی فعال شده و سپس سایر کاسپازها را فعال می‌کنند، که این امر منجر بـه فعـال شدن کاسپازهای اجرایی می گردد. این آبشار کاتالیتیکی در نهایت سبب مرگ سلولی می شود. اگر چه هنـوز مشـخص نشـده است که چه طور فعالیت کاسپازها مستقیماً منجر به مرگ آپوپتوزی سلولی می شود، امـا بـه احتمال زیاد این عمل را از طریق تخریب مولکول های حیاتی برای بقای سلول انجام می دهد.

نتایج این پژوهش نشان داد تیمار با ریشه کودزو سبب کاهش گلوکز، کلسترول، تری گلیسرید و کاهش وزن نمونه های دیابتی می شود. هم چنین میزان انسولین سرم در گروه های دیابتی به طور معنی داری کاهش یافت که با تحقیقات محققین گذشته هم سو می باشد.

بیماران دیابتی به دلیل اختلال عصبی و عروقی مستعد مشکلاتی در عملکرد جنسی خود هستند که شامل کاهش هیجان جنسی، ناتوانی جنسی و نازایی است(۸). دیابت شیرین اثرهای عملکردی و ساختاری متنوع بر سیستم تولیدمثل نر دارد. شواهد موجود مشخص کرد که استرس اکسیداتیو در بیماران دیابتی به دلیل تولید بیش از حد اکسیژن باز فعال شده(Ros) افزایش می یابد که در نتیجه باعث کاهش کارآیی دفاع آنتی اکسیدانی می شود(۵). اکسیداسیون لیپیدها، پروتئین ها و ماکرو مولکول های دیگر در طول گسترش دیابت اتفاق می افتد(۷). موتاسیون در DNA میتوکندریایی، هم چنین در بافت های دیابتی گزارش شده است، که یک نوع استرس اکسیداتیو وابسته به آسیب میتوکندریایی است(۱۰). سلول های اسپرم پستانداران دارای محتوای لیپیدی با مقادیر زیادی از اسیدهای چرب غیر اشباع، پلاسما لوژن ها و اسفنگومیلین می باشد. لیپیدهای موجود در اسپر ماتوزوآ ماده اصلی برای عمل پراکسیداسیون می باشند(۱۳). این ویژگی بافت بیضه را به کانونی مناسب برای تولید رادیکال های آزاد ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها تبدیل کرده در نتیجه تولید رادیکال های آزاد را افزایش می دهد. به علاوه سلول ها در این بافت به طور متناوب در حال تقسیم بوده در نتیجه متابولیسم در آن ها بالا است، این جریان سبب تولید رادیکال های آزاد بیشتر می شود که به دلیل ضعف سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی در جریان دیابت تجمع این رادیکال ها در سلول بیش از حد معمول می گردد. رادیکال های آزاد ایجاد شده از مسیرهای متفاوت درون سلولی بر فعالیت های سلول اثر گذاشته و سبب تشدید آپوپتوز و تخریب بافتی در بیضه می باشند. در این پژوهش نیز میزان آپوپتوز در نمونه های تیمار شده با کودزو کاهش یافته است(نمودار شماره ۵). با توجه به خواص ذکر شده در پژوهش حاضر این دارو به عنوان عاملی که از دو طریق، غیرمستقیم با آثار کاهنده قندخون و در نتیجه کاهش استرس اکسیداتیو و آثار مخرب آن به طور مستقیم از طریق اثر بر واکنش های متابولیسمی درون سلولی، سبب بهبود آسیب بافتی ناشی از دیابت می گردد، تجویز شد. سنجش میزان قندخون نشان دهنده کاهش در گروه درمانی نسبت به گروه دیابتی بوده به علاوه مقدار انسولین که در نمونه های دیابتی به طور معنی داری کاهش یافته بوده در گروه درمانی افزایش یافته است(نمودار شماره ۱). اولین بار تاثیر پورریا(پورریا یکی از اصلی ترین اجزاء ترکیب ریشه کودزو است)(۱۹) بر ضد پرفشاری خون در سال ۱۹۸۰ گزارش شده است و قطعاً مربوط بود به استفاده از طب سنتی از ریشه کدزو است. عصاره پورریا اثر ضد فشار

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.2.167]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:49 IRST on Saturday February 27th 2021

خون دارد که تجمع مقدار زیادی از ایزو فلاونیدها به ویژه پوررین است که تاثیر به سزایی در درمان دیابت دارد که در انواعی از مدل های حیوانی اشاره شده است(۲۵،۴۵). این مکانیسم ها سبب کنترل استرس اکسیداتیو و در نتیجه بهبود عوارض مخرب رادیکال های آزاد بر بافت شده سبب بازسازی سلول های بافت بیضه می گردد(۳۰). گزارش های قبلی حاکی است که اندازه بیضه ها به شدت با تعداد سلول های سرتولی و تولید اسپرم مرتبط است به عبارت دیگر اندازه بیضه ها منعکس کننده تعداد سلول های زاینده موجود در آن است. مهار اسپرماتوژنز از طریق برداشتن هیپوفیز باعث کاهش محسوس در وزن بیضه می شود(۲۸). نتایج به دست آمده در بررسی های بافتی نشان داد در اثر دیابت سلول های رده اسپرم ساز و سرتولی، دچار تغییر و کاهش شده که این کاهش به خصوص در مورد سلول سرتولی بسیار محسوس می باشد، به علاوه کاهش قطر توبول سمینی فروس و افزایش قطر غشاء پایه نیز مشاهده شد(شکل شماره ۱ و ۲). این نتیجه موید موارد گزارش شده در مطالعات دیگر است مبنی بر این که مطالعه های مورفومتری تغییرات چشمگیر در قطر توبول سمینی فروس و مهار اسپرماتوژنز در مراحل اسپرماتوسیتی III و II را در توبول های کوچک حیوانات دیابتی نشان داده اند(۲۳). کیفیت پایین مایع سمینال در افراد دیابتی نیز گزارش شده است که شامل کاهش حرکت اسپرم(۲۳)، کاهش شمار اسپرم و افزایش اسپرم های ناهنجار است(۲۰). ما نیز در این تحقیق کاهش تحرک و شمار اسپرم و هم چنین کاهش pH مایع سمینال را مشاهده کردیم. کاهش تراکم اسپرم را باید به دلیل اثر شدید افزایش قندخون بر مراحل آخر اسپرماتوژنز دانست. القای تخریب DNA در هسته اسپرم و نقص در اسپرماتوژنز بر پتانسیل باروری اثر می گذارد(۱۴). کودزو با کاهش قندخون سبب افزایش اسپرم و تحرک آن در گروه درمانی شد. تستوسترون توسط سلول های میان بافتی لایدیگ در بیضه ها ترشح می شود اما ترشح آن فقط هنگامی انجام می شود که این سلول ها توسط هورمون لوتئینی از غده هیپوفیز قدامی تحریک شوند(۶). بر اساس تئوری رادیکال های آزاد عدم تعادل میان پرواکسیدانت ها و آنتی اکسیدانت ها نهایتاً موجب صدمات اکسیداتیو در فرآیندهای سلولی و کاهش استروئیدوژنز در سلول های لایدیگ می گردد(۷).

مشاهده محافظت کبدی کدزو به خوبی یک آنتی اکسیدان بالقوه ممکن است نشان دهنده علت عملکرد ضد دیابتی آن باشد(۳۸). نشان داده شده که که ریشه کودزو به واسطه داشتن خاصیت آنتی اکسیدانی نقش محافظتی در آسیب سلولی بافت پانکراس دارد. به علاوه، افزایش آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز و کاهش پراکسیداسیون چربی تحت تاثیر حضور ریشه کودزو توانسته بود از آسیب حاصل از استرپتوزوسین در بافت پانکراس به طور معنی داری بکاهد(۳۹). Gosh و همکاران در سال ۲۰۰۵ به این نتیجه رسیدند که افزایش استرس اکسیداتیو متعاقب بیماری دیابت باعث افزایش میزان ROS و کاهش ظرفیت دفاع آنتی اکسیدانی شده و در نتیجه مرگ سلول های بافت یا الگوی آپوپتوز روی می دهد. هم چنین، حضور عوامل آنتی اکسیدانی نظیر گلوتاتیون پراکسیداز نقش دفاعی و محافظتی در کاهش مرگ سلول های قلبی متعاقب کاردیومیوپاتی دیابتی دارد و ریشه کودزو با بالا بردن دفاع آنتی اکسیدانی باعث کاهش آپوپتوز سلول های بافت بیضه دیابتی می گردد(۴۰). در این تحقیق، تغییرات آپوپتوز سلول های بافت بیضه در گروه دیابتی در مقایسه با گروه دیابتی دریافت کننده ریشه کودزو و گروه سالم دریافت کننده حامل دارو و سالم دریافت کننده عصاره معنی دار بود و با بررسی عمیق به نتایج مطالعات Abir و Gosh می توان چنین بیان نمود که ریشه کودزو به عنوان یک ماده آنتی اکسیدان می تواند با کاهش میزان استرس کسیداتیو و بالا بردن دفاع آنتی اکسیدانی به طور معنی داری از آسیب سلول های بافت بیضه دیابتی پیشگیری نماید(۴۱).

بر اساس مطالعات Podesta و همکاران در سال ۲۰۰۰ محصولات نهایی حاصل از گلیکوزیلاسیون که افزایش HbA1c، ROS و باعث آسیب سلولی و حتی القاء آپوپتوز سلول های قلبی می گردد. تغییرات میزان قندخون در مطالعه حاضر

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.2.167]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:49 IRST on Saturday February 27th 2021

نیز نشانگر تاثیر نزولی میـزان قنـدخون ریشه کودزو بود، به طوری کـه اخـتلاف میـانگین قندخون در گروه دیابتی با گروه های دیگر آزمایشی معنـی دار بوده و موافق نتایج سایر مطالعات می باشـد(۴۲).

در مطالعه Ashok Agarwal ۲۰۱۱ توکسیکانت های محیطی و آپوپتوز تستیکولار، وقتی که آپوپتوز به طور غلط در بیضه ها فعال شد، می تواند نتیجه کار کانسر باشد. آپوپتـوز سلول هـای بافت بیضه در بیمـاری دیابـت از مسـیرهـای مختلفـی راه اندازی می گردد. یکی از ایـن مسـیرها افـزایش هموگلـوبین گلیکوزیله(HbA1c) متعاقب دیابت اسـت. گلـوکز بـدون کمـک آنـزیم هـا و بـه طـور شیمیایی به گروه های آمینی و پروتئین ها متصل مـی شـود و از این طریق محصولات گلیکوزیلاسیون تولید می گردد کـه ایـن مواد ممکن است بازآرایی شـده و محصـولات گلیکوزیلاسـیون زودرس و پایـداری بـه نـام نـوع آمـادوری(Amadori-Type) ایجاد کنند. درجه گلیکوزیلاسـیون آنزیمـی بـه طـور مسـتقیم وابسته به مقدار گلوکز خون است. از نتـایج مطالعـه sanjoy gosh و همکاران وی در سال ۲۰۰۵ وقـوع ایـن نـوع از مـرگ سلولی را می توان چنین تفسیر نمود که دیابت و بالا رفتن قند خون در بیمار باعث القاء کاهش میزان GSH یا گلوتـاتیون در میتوکندری سلول هـای قلبی و افزایش تولید میزان رادیکاهـای آزاد اکسیژن، شکل گیری کانال های غشـایی در میتوکنـدری و فعال شدن کاسپازهای ۹ و ۳ و در نهایت آپوپتـوز سـلول هـای قلبی می گردد. پس می توان نتیجه گیری نمود، هـر عـاملی کـه باعث افـزایش دفـاع آنتـی اکسـیدانی و کـاهش تولیـد عوامـل رادیکـال آزاد گـردد، مـی توانـد از آسـیب هـای حاصـل از استرس های اکسیداتیو را که سـلول هـای قلبـی را در بیمـاری دیابت تهدید می کنـد، بکاهـد(۴۳).

در خاتمه به نظر می رسد که این آثار محافظت کننده ناشی از نقش کدزو به عنوان جمع کننده رادیکال های آزاد، آنتی اکسیدان و نقش ضد آپوپتوتیک یا به عنوان عامل ضد التهابی بوده به نظر می رسد که کدزو به عنوان یک عامل ایجادکننده تعادل اکسیدان و آنتی اکسیدان درآینده نقش درمانی مهمی در کاهش آسیب های بیضه ای متعاقب دیابت در بیماران دیابتی ایفا نماید .

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه منیره شهسواری برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته سلول و تکوین دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان است. بدین وسیله از همه عزیزانی که مارا در انجام این مطالعه یاری نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می نماییم.

References

1. Capellini VK, Celotto AC, Baldo CF, Olivon VC, Viaro F, Rodrigues AJ, Evora PR. Diabetes and vascular disease: basic concepts of nitric oxide physiology, endothelial dysfunction, oxidative stress and therapeutic possibilities. Curr Vasc Pharmacol 2010;8:526-44.

2 .Popbusui R, Anders S, Stevens M. Diabetic neuropathy and oxidative stress. Diabet Metab Res Rev 2006;22:257-73.

3 .Jawa A, Kcomt J, Fonseca VA. Diabetic noropathy and retinopathy .Med Clin North Am 2004;88;1001-36

4.Ahmed RG. The physiological and biochemical effects of diabetes on the balance between oxidative stress and antioxidant defense system. Med J Islamic World Acad Sci 2005;15:31-42.

5.Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species lipid peroxidation and human sperm function. Biol Reprod 1989;41:183-97.

6. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications of diabetes. Diabetes 1991; 40: 405-12.

7. Ghada M, Nabil A, Mohamed A,El H. some biophysical investigations on Diabetes mellitus with relevant to oxidative stress and antioxidant .J World Appl Sci 2014;32:2020-27.

8. Baccetti B, Lamarca A, Piomboni P, Capitani S, Bruni E, Petraglia F et al. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. Hum Rep2002;17: 2673-77.

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.2.167]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:49 IRST on Saturday February 27th 2021

9.Balasubramanian K, Sivashanmugam P, Thameemdheen S, Govindarajulu P. Effect of diabetes mellitus on epididymal enzymes of adult rats. J Indian Exp Biol 1991; 29: 907-9.
10. Scarano WR, Messias AG, Oliva SU, Klinefelter GR, Kempinas WG. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term Streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. Int J Androl 2006;29:482-8.
11. Yagihashi S, Yamagishi SI, Wada R, Baba M, Hohman TC, Yabenishimura C, et al. Neuropathy in diabetic miceoverexpressing human aldose reductase and effects of aldose reductase inhibitor. J Brain 2001;124:2448-58.
12. Jakus V, Rietbrock N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. Physiol Res2004;53:131-42.
13. Popbusui R, Marinescu V, Huysen C, Sullivan K, Greene DA, et al. Dissection of metabolic, vascular, and nerve conduction interrelationships in experimental diabetic neuropathy by cyclooxygenase inhibition and acetyl-L-carnitine administration. Diabetes 2002;51:2619-28.
14. Kellogg AP, Popbusui R. Peripheral nerve dysfunction in experimental diabetes is mediated by cyclooxygenase-2 and oxidative stress. Antioxid Red Sign2005;7:1521-29.
15. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature 2000;404 :787-90.
16. Liu Q, Chen L, Hu L, Guo Y, Shen X. Small molecules from natural sources targeting signaling pathways in diabetes. Biochim Biophys Acta2010;1799:854-65.
17. Li TK, Bathory E, Lavoie EJ, Srinivasan AR, Olson WK, Sauers RR, et al. Human topoisomerase I poisoning by Kudzu: potential roles for both drug–DNA and drug-enzyme interactions. Biochemistry 2000;39:7107-16.
18. Lee CM, Yoon MS, Kim YC. Effects of Pueraria lobata root ethanol extract on adipogenesis and lipogenesis during 3T3-L1 differentiation into adipocytes. Toxicol Res2015;31:191-201.
19. LI W, Zhao Y, Wang W, ZU Y. Effects of Puerarin on glucose infusion rate in insulin resistance rat fed with fructose. J CH Med 2007;9:493-95.
20.Leng SH, Lu FE, Xu LJ. Therapeutic effects of Kudzu in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion. Acta Pharmacol Sin 2004;25:496-502.
21.Birdsall TC, Kelly GS. Berberine therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. Altern Med Rev 1997;2:94-103.
22. Han R, Takahashi H, Nakamura M, Yoshimoto N, Suzuki H, Shibata D. Transcriptomic landscape of pueraria lobata demonstrates potential for phytochemical study. Front Plant Sci2015; 22;6:426.
23. Baccetti B, Lamarca A, Piomboni P, Capitani S, Bruni E, Petraglia F, et al. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. Hum Reprod 2002;17:2673-77.
24. Shen L, Ji HF. The mechanisms of ROS photogeneration by berberine a natural isoquinoline alkaloid. J Photochem Photobiol2010;99:154-6.
25. Lu XR, Gao E, Xu LZ, Li HZ, Kang B, Chen WN, et al. Puerarin beta-adrenergic receptor blocking effect. J Med Chinese1987;100:25-8 .
26. Wong KH, Li GQ, Li KM, Razmovskin V, Chan K. Kudzu root traditional uses and potential medicinal benefits in diabetes and cardiovascular diseases. J Eth pharm 2011; 134: 584–607 .
27. Amaral S, Moreno AJ, Santos MS, Seic R, Ramalho J. Effects of hyperglycemia on sperm and testicular cells of Goto-Kakizaki and Streptozotocin-treated Rat models for diabetes. Theriogenology 2006;66:2056-67.
28. Scarano WR, Messias AG, Oliva SU, Klinefelter GR, Kempinas WG. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term Streptozotocin-induced hyperglycaemia in Rats. Int J Androl 2006;29:482-8.
29. Zhang XD, Ren HM, Liu L. Effects of different dose berberine on hemodynamic parameters and [Ca2+]i of cardiac myocytes ofdiastolic heart failure rat model. J Chinese Mat Med 2008;33:818-21.

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.2.167]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:49 IRST on Saturday February 27th 2021

30. Sheikhpour R. Diabetes and oxidative stress the mechanism and action. J Iran Diabet Obes 2013:5 40-45.
31. Lee S, Lim HJ, Park JH, Lee KS, Jang Y, Park HY. Kudzu -induced LDLR up-regulation involves JNK pathway. Biochem Biophys Res Commun 2007;362:853-57.
32.Shapiro K, Gong WC. Natural products used for diabetes. J Am Pharm Assoc 2002; 42: 217-26.
33. Samuelsen AB. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of Plantago major L. J Ethnopharmacol 2000; 71:1-21.
34. Demelo JG, Desousa TA, Almeida E, Castro V, et al. Antiproliferative activity antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. Molecules 2010;15: 8534-42.
35.Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. The most unkindest cut of all on the multiple roles of mammalian caspases. Leukemia 2000;14:1514- 25.
36.Salami S, Karamitehrani F. Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines. Clin Biochem 2003; 36:247-53.
37.Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. Exp Cell Res 2000; 256:12-8.
38. Mantena SK, Sharma SD, Katiyar SK. Berberin, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. Mol Cancer Ther 2006;5:296-08.
39. Yu Du, Huauifamg G, Hangxiang L. Grape seed polyphenols cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. J Agri Food Chem 2007; 55: 1695-701.
40. Jianxun W, Ye S, Qian W, Patricia MK. Causes and characteristics of diabetic cardiomyopathy. Rev Diabet Stud2006;3: 108-17.
41. Saad AA, Youssef MI, Elshennawy LK. Cisplatin induced damage in kidney genomic DNA and nephrotoxicity in male Rats the protective effect of grape seed Proanthocyanidin extract. Food Chem Toxicol 2009; 7: 1499-06.
42. ELaify AT, Ahmed AE, Fatani AJ. Protective effect of red grape seeds Proanthocyanidins against induction of diabetes by Alloaxn in Rats. Pharmacol Res 2005;52:264-70.
43. Hwang IK, Kim DW, Park JH, Lim SS, Yoo KY, Kwon DY, et al. Effects of grape seed extract and its ethylacetate ethanol fraction on blood glucose levels in a model of type 2 diabetes. Phytother Res 2009; 23: 1182-85.
44. Podesta F, Romeo G, Liu WH, Krajewski S, Reed JC, Gerhardinger C, et al. Bax is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. Am J Pathol 2000; 156: 1025-32.
45. Wang Q, Wu T, Chen X, Ni J, Duan X, Zheng J, et al. Puerarin injection for unstable angina pectoris. Sys Rev2006;3: 41-50.

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.2.167]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 12:49 IRST on Saturday February 27th 2021

Effect of Root Kudzu on Caspease-3 Activity by Immunohistochemy Method in the Testis in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

*Shahsavari M[1], Norouzi P[2], Kalalianmoghaddam H [*2], Hojati V[1]*

(Received: April 15, 2015 Accepted: August 25, 2015)

Abstract

Introduction: Apoptosis or programmed cell death plays an important role in the pathogenesis of many diseases. Diabetes mellitus is a devastating effect on reproductive system of male sexual function in human and animal models and increased apoptosis. Kudzu root is an ISO Flavonin and saponins and often is used as a reducing agent is glucose. Kudzu is able to lower blood glucose in non-insulin dependent and also, by eliminating free radicals that lead to the reduction of oxidative stress. This study was conducted on the effect of Kudzu roots on apoptosis in the testes of rats diabetic.

Materials & methods: In this study, 32 male Wistar rats were randomly selected and divided into four groups: control, diabetic rats, diabetic rats treated with Kudzu 100 mg/kg, diabetic rats treated with Kudzu 50 mg / kg. Diabetic by intraperitoneal injection of streptozotocin55 mg/kg was induced. One week after injection, they were treated with a dose Kudzu 50 and 100 mg/kg for five weeks using gavage. Testicular damage by H & E staining and immunohistochemistry and hormonal and Blood biochemical factors were measured.

Findings: Diabetic rats showed a significant increase in apoptosis in the testis. Decrease in seminiferous tubule diameter of diabetic rats, Sertoli cells, sperm count,Insulin and testosterone levels were shown. In rats treated with Kudzu roots it resulted in significant reduction of apoptosis in diabetic rats and significantly increased body weight, plasma Insulin and testosterone levels. It was observed that the oral administration roots of Kudzu increase sperm count, sperm cell of Sertoli cells.

Discussion & Conclusions: The results of this study confirmed the occurrence of apoptosis in diabetes and root Kudzu of the anti-apoptotic effect notes.

Keywords: Diabetes, Kudzu roots, Spermatogenesis, Apoptosis, Rat

1.Dept of Biology, Islamic Azad University , Damghan Branch, Damghan, Iran
2.Dept of Physiology, Faculty of of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran
**Corresponding author Email: h.kalalian@gmail.com*