Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

Protective Effects of Boswellia Thurifera Aqueous Extract against Cisplatin-Induced Cytotoxicity on Sperm Quality in Mice

Hadi Ghorbani[1], Mohammad Ali Ebrahimi Saadatlou[1], Abolfazl Hajibemani[2*]

[1] Dept of Histology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
[2] Dept of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 19 May 2021
Revised: 26 June 2021
Accepted: 22 December 2021

**** Correspondence to:***
Abolfazl Hajibemani
Dept of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
Email: a.hajibemani@tabrizu.ac.ir

A B S T R A C T

Introduction: Cisplatin (CIS) is among the chemotherapeutic agent. However, its use is limited due to side effects, such as impairment in the spermatogenesis process. On the other hand, Boswellia Thurifera has protective effects on the reproductive system. Therefore, the present study aimed to investigate the protective effect of Boswellia Thurifera aqueous extract against cisplatin-induced cytotoxicity on sperm parameters in mice.

Material & Methods: In this experimental study, 32 male mice were divided into four groups (n=8). The first group (the control group) was given isotonic saline for 35 consecutive days. Boswellia thurifera aqueous extract was orally administered to the second group at the dose of 500 mg/kg/day for 35 consecutive days without CIS. The mice in the third group were treated with an intraperitoneal injection of CIS (5.5 mg/kg). Finally, the last group received CIS and Boswellia thurifera aqueous extract together at the same doses. On the next day, after the last injection, body and testis weight, as well as sperm count, motility, viability, and morphology were evaluated.
(Ethic code: 10210501972004)

Findings: CIS alone led to a significant reduction in sperm motility, viability, and morphology, compared to the control group (P<0.001). However, CIS+Boswellia thurifera aqueous extract and Boswellia thurifera aqueous extract alone increased the sperm count, motility, and viability; moreover, they decreased the abnormal sperms, compared to the CIS group (P<0.001).

Discussion & Conclusion: The results of the current study demonstrated that CIS decreased sperm quality, and the coadministration of Boswellia thurifera aqueous extract reduced CIS-induced cytotoxicity and improved the sperm quality. In conclusion, the Boswellia thurifera aqueous extract is useful for the reduction of limitationthe toxic effects of CIS and improvement of the parameters of sperm quality.

Keywords: Boswellia thurifera, Cisplatin, Mice, Sperm

➢ **How to cite this paper**

Ghorbani H, Ebrahimi Sadatlou M, Hajibemani A. Protective Effects of Boswellia Thurifera Aqueous Extract against Cisplatin-Induced Cytotoxicity on Sperm Quality in Mice. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(1): 19-28.

© The Author(s)
Publisher: Ilam University of Medical Sciences

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

JIUMS

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸

E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

تأثیر حمایتی عصارهٔ آبی کندر بر میزان سمیت سلولی سیس‌پلاتین روی کیفیت اسپرم در موش سوری

هادی قربانی[۱]، محمدعلی ابراهیمی سعادتلو[۱]، ابوالفضل حاجی بمانی شورکی[۲*]

[۱] گروه علوم پایه، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، تبریز، ایران

[۲] گروه علوم درمانگاهی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۹

تاریخ داوری: ۱۴۰۰/۰۴/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۰۱

نویسنده مسئول:

ابوالفضل حاجی بمانی شورکی

گروه علوم درمانگاهی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

Email:

a.hajibemani@tabrizu.ac.ir

چکیده

مقدمه: سیس‌پلاتین ازجمله داروهای شیمی‌درمانی است؛ اما استفاده از آن به علت عوارض جانبی ازجمله تداخل در فرایند اسپرماتوژنز محدودشده است. از سویی، کندر آثار بهبودی بر دستگاه تولیدمثل دارد؛ بنابراین، هدف مطالعهٔ حاضر بررسی تأثیر حمایتی عصارهٔ آبی کندر بر میزان سمیت سلولی سیس‌پلاتین روی شاخص‌های اسپرم در موش سوری بود.

مواد و روش ها: برای انجام این مطالعه، ۳۲ سر موش سوری به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند: گروه اول گروه کنترل بود که تنها محلول نرمال سالین به مدت ۳۵ روز دریافت کرد؛ به گروه دوم، تنها عصارهٔ آبی کندر با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۳۵ روز گاواژ داده و به گروه سوم، داروی سیس‌پلاتین با دوز ۵/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم به روش داخل صفاقی تزریق و به گروه چهارم داروی سیس‌پلاتین به همراه عصارهٔ آبی کندر با همان دوزها داده شد. روز بعد از آخرین تزریق، وزن بدن و بیضه، تعداد، تحرک، میزان زنده ماندن و مورفولوژی اسپرم‌ها ارزیابی گردید.

یافته‌ها: سیس‌پلاتین به‌تنهایی موجب کاهش تحرک، زنده‌مانی و مورفولوژی طبیعی اسپرم‌ها در مقایسه با گروه کنترل شد ($P<0.001$)؛ اما سیس‌پلاتین به همراه کندر و گروه کندر به‌تنهایی باعث افزایش تحرک، غلظت و زنده‌مانی و کاهش اسپرم‌های غیرطبیعی در مقایسه با گروه سیس‌پلاتین گردید ($P<0.001$).

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که سیس‌پلاتین موجب کاهش کیفیت اسپرم می‌شود و با دادن کندر، آثار سمی سیس‌پلاتین روی اسپرم کاهش می‌یابد و باعث بهبودی شاخص‌های اسپرم می‌گردد؛ درنتیجه، استفاده از عصارهٔ آبی کندر به‌منظور کاهش آثار سمی سیس‌پلاتین و بهبود کیفی مؤلفه‌های کیفی اسپرم سودمند است.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، سیس‌پلاتین، کندر، موش سوری

استناد: قربانی، هادی؛ ابراهیمی سعادتلو، محمد علی؛ حاجی بمانی شورکی، ابوالفضل؛ تأثیر حمایتی عصارهٔ آبی کندر بر میزان سمیت سلولی سیس‌پلاتین روی کیفیت اسپرم در موش سوری. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، اردیبهشت ۱۴۰۱؛۳۰(۱): ۲۸-۱۹.

CC BY NC

حق‌مؤلف © نویسندگان

مقدمه

سیس‌پلاتین ازجمله داروهای شیمی‌درمانی مؤثر در درمان بسیاری از سرطان‌ها همچون سرطان بیضه، تخمدان، ریه، مثانه و لنفوم‌ها است (۱). مصرف عمدهٔ سیس‌پلاتین برای سرطان بخش‌های درون‌ریز بدن ازجمله تخمدان و بیضه است که میزان موفقیت آن در درمان سرطان بیضه ۹۰ درصد است (۵-۲). سازوکار عمل ضدسرطانی این دارو به‌خوبی شناخته‌نشده؛ اما بیان‌شده است که با اتصال به DNA، به شکل‌گیری اتصالات متقاطع درون‌رشته‌ای و بین‌رشته‌ای منجر می‌شود (۱). اتصالات متقاطع باعث ایجاد نمونه‌های معیوب DNA می‌گردد و درنتیجه، سنتز DNA و رونویسی روی آن متوقف می‌شود (۶). در سلول‌هایی که تقسیم سریع دارند؛ مانند سلول‌های سرطانی، اتصالات متقاطع می‌تواند آسیب بیشتری به DNA وارد کند. آسیب‌های خفیفی که به DNAوارد شود، قابل ترمیم هستند؛ اما آسیب‌های گسترده به ضایعات غیرقابل‌برگشت و مرگ سلولی منجر می‌شوند. القای آپوپتوز نیز یکی دیگر از سازوکارهای سلولی سیس‌پلاتین در از بین بردن سلول‌های سرطانی است (۷).

سیس‌پلاتین الکیله‌کننده نیست؛ اما خاصیت الکیله‌کننده دارد و موجب تغییرات بیوشیمیایی و بافتی در بیضه ازجمله اپیتلیوم ژرمینال می‌گردد (۹، ۸). سیس‌پلاتین یک درمان اصلی برای سرطان به‌شمار می‌رود؛ اما استفاده از آن به علت عوارض جانبی شدید آن محدودشده است. عوارض جانبی درمان با سیس‌پلاتین شامل تهوع، استفراغ، کاهش تولید سلول‌های خونی و پلاکت‌ها از مغز استخوان، کاهش پاسخ به عفونت‌ها (سرکوب ایمنی)، آسیب به کلیه‌ها، اعصاب و دستگاه شنوایی و تداخل در فرایند اسپرماتوژنز است (۱۰، ۳).

دربارهٔ نحوهٔ آسیب رساندن این دارو بر اسپرماتوژنز سازوکارهای گوناگونی مطرح‌شده که آپوپتوز و شکست زنجیره‌ای DNA ازجملهٔ مهم‌ترین آن‌ها است. مصرف سیس‌پلاتین در نمونه‌های حیوانی به ایجاد اسپرم‌های غیرطبیعی و کاهش تحرک اسپرم منجر شده است (۱۲، ۱۱).

امروزه، گیاهان دارویی به علت خاصیت ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و داشتن ضرر کمتر نسبت به ترکیبات شیمیایی، استفادهٔ گسترده‌ای پیدا کرده‌اند. در طب سنتی، استفاده از گیاهان دارویی متداول‌ترین روش برای درمان بیماری‌ها در جوامع بشری بوده است. در سال‌های اخیر، تحقیقات بسیاری در ارتباط با آثار گیاهان مختلف روی باروری پستانداران، بافت بیضه و محور هورمونی هیپوفیز-گناد انجام‌شده است. کندر ازجملهٔ این گیاهان است (۱۷-۱۳). کندر صمغ رزینی است که از درخت بنه (Boswellia Thurifera) تهیه می‌شود. این گیاه در طب سنتی طبیعت گرم و خشک دارد و بومی نواحی مختلف نظیر ایران، شمال آفریقا و هند است. از کندر به‌عنوان ضدالتهاب، ضدآرتریت و مسکن در درمان بیماری‌های مزمن روده، آسم، ادم مغزی و سایر بیماری‌ها استفاده‌شده است (۲۰-۱۸). در مطالعه‌ای که به بررسی اثر کندر روی دستگاه تولیدمثل و باروری موش‌های نر بالغ انجام شد، مصرف خوراکی کندر باروری را در موش‌ها افزایش داد (۲۱). علاوه بر این، میزان لانه‌گزینی و تعداد جنین‌های زنده نیز افزایش یافت که احتمالاً به علت افزایش حرکت و تراکم اسپرم است؛ همچنین افزایش معنی‌داری در حرکت اسپرم و دم اپیدیدیم در گروه درمان دیده شد (۲۱).

با توجه به این‌که تاکنون مطالعه‌ای برای تأثیر کندر به‌منظور کاهش آسیب‌های روی اسپرم ناشی از درمان با سیس‌پلاتین انجام‌نشده است؛ بنابراین، مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی تأثیر محافظتی کندر روی مؤلفه‌های اسپرم متعاقب شیمی‌درمانی با استفاده از سیس‌پلاتین در موش سوری صورت گرفته است.

مواد و روش ها

برای انجام این مطالعه، ۳۲ سر موش سوری نژاد

NMRI نر با وزن ۵±۳۰ گرم در مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی، در شرایط استاندارد با دمای ۲۲°C، رطوبت حدود ۶۰ درصد و با سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. آب و غذا به‌صورت آزاد در دسترس بود. همهٔ مراحل آزمایش در آزمایشگاه دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، بر اساس قوانین بین‌المللی نگهداری و مراقبت از حیوانات و با نظارت کمیته پژوهشی با کد شناسهٔ 10210501972004 انجام گردید.

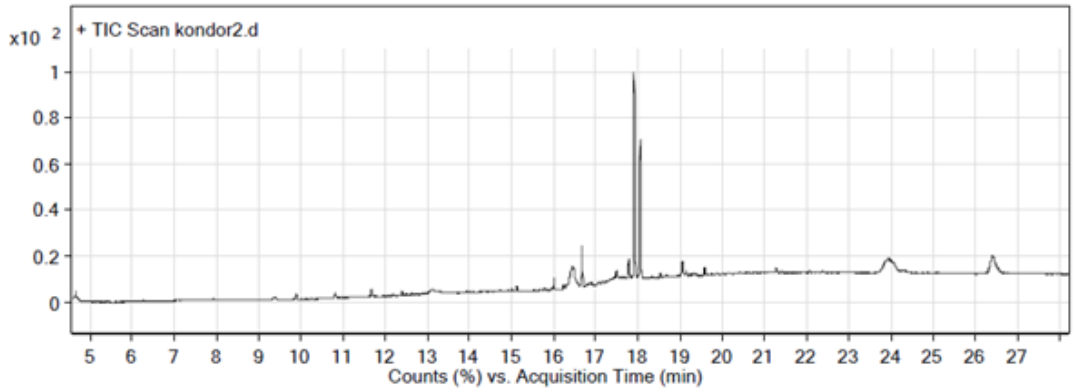
موش‌ها به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند: گروه اول (گروه کنترل)، تنها محلول نرمال سالین به مدت ۳۵ روز دریافت کرد و به گروه دوم، تنها عصارهٔ کندر با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۳۵ روز گاواژ داده (۲۳، ۲۲، ۱۵) و به گروه سوم، داروی سیس‌پلاتین با دوز ۵/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم به روش داخل صفاقی تزریق شد (۲۶-۲۴). گروه چهارم علاوه بر سیس‌پلاتین، عصارهٔ آبی کندر با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۳۵ روز دریافت کرد.

روش تهیهٔ عصارهٔ کندر: میزان ۲۰۰ گرم صمغ کندر را آسیاب کرده و به‌صورت پودر درآورده، درون مخلوط آب مقطر دست‌کم به مدت ۲۴ ساعت به‌وسیلهٔ شیکر هم زده شد؛ سپس مخلوط به‌دست‌آمده تحت‌فشار خلأ درون دستگاه روتاری اوپراتور حلال‌زدایی گردید تا عصارهٔ خام به‌دست آید. عصارهٔ خام به‌دست‌آمده در سرم فیزیولوژی حل شد تا محلول عصارهٔ ۱۰۰ درصد به‌دست آید. از این محلول به‌صورت روزانه، به موش‌های مطالعه شده به روش گاواژ معدی خورانده شد (۲۷).

فرایند استخراج مواد مؤثر گیاهی: به این منظور، مقدار ۰/۵ گرم از نمونهٔ چسب بافت به‌دست‌آمده از گونهٔ گیاهی نمونه‌برداری‌شده وزن گردید و سپس عمل استخراج با استفاده از مخلوط حلال اتیل استات و n-هگزان (نسبت ۱:۱)، در حضور ۰/۱ گرم نمک سدیم کلرید به مدت ۱۵ دقیقه بر روی دستگاه همزن / هیتر برقی انجام شد. محلول استخراج یافته پس از آب‌زدایی به کمک نمک سولفات سدیم، آمادهٔ تزریق به دستگاه GC/MS گردید (۲۹، ۲۸).

آنالیز کندر استفاده‌شده در این پژوهش: برای شناسایی ترکیبات شیمیایی و مواد مؤثر عصارهٔ گیاه کندر، از دستگاه کروماتوگراف گازی-طیف‌سنج جرمی (GC/MS) استفاده شد که شامل کروماتوگرافی گازی مدل 7890B و طیف‌سنج جرمی مدل 5977A ساخت شرکت Agilent آمریکا، مجهز به سامانهٔ تزریقی از نوع split/splitless و مدل یونیزاسیون بمباران الکترونی بود و کتابخانه‌های جرمی مربوط به NIST و WILEY داشت. به‌منظور آنالیز ترکیبات مدنظر، از ستون HP5-MS به طول ۶۰ متر با قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. دمای محل تزریق، دمای Interface و دمای محل یونیزاسیون به ترتیب روی ۲۸۰، ۲۹۰ و ۲۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد تنظیم گردید. برنامهٔ دمایی ستون با دمای اولیهٔ ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد شروع و به مدت ۵ دقیقه در این دما نگه داشته شد؛ سپس دمای ستون با شیب ۱۰ درجهٔ سانتی‌گراد در دقیقه به دمای ۱۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد رسید و به مدت ۲ دقیقه در این دما ثابت ماند و درنهایت، با شیب ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد بر دقیقه به دمای ۲۹۰ رسید و ۵ دقیقه در این دما ثابت ماند. نسبت split به‌صورت ۱ به ۲۰ تنظیم گردید و حجم تزریقی نیم میکرولیتر بود (۲۹، ۲۸). مشخصات آنالیز عصارهٔ گیاه کندر در شکل و جدول شمارهٔ ۱ آمده است.

نمونه‌گیری: پس از گذشت مدت‌زمان ۳۵ روز، موش‌ها بیهوش گردید و به روش جابه‌جایی مهرهٔ گردن، کشته و پس از آن، پوست ناحیهٔ شکمی با اتانول ۷۰ درصد استریل و با ایجاد برش در ناحیهٔ شکم و پس از جدا کردن بافت‌های همبندی اطراف و دم اپیدیدیم، بیضه‌ها وزن کرده، دم اپیدیدیم داخل میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت Human Tubal Fluid(HTF) قرار داده شد.



شکل شمارهٔ ۱. کروماتوگرام مربوط به عصارهٔ گیاه کندر

جدول شمارهٔ ۱. نام و مشخصات ترکیبات شیمیایی موجود در عصارهٔ گیاه کندر

ردیف	نام ترکیب	نام لاتین	زمان بازداری	ترکیب درصد	فرمول مولکولی
۱	اولئیک‌اسید	Oleic acid	۱۷/۴۸	۱/۷۳	C18H34O2
۲	پالمیتیک‌اسید	Palmitic acid	۱۵/۱۱	۰/۴۵	C17H34O2
۳	اینسنزول اکسید	Incensole oxide	۱۹/۰۶	۲/۸	C20H34O3
۴	ایزومر سیس اینسنزول	Cis-Incensole isomer	۱۸/۰۵	۱۴/۵۲	C20H34O2
۵	ایزومر ترانس اینسنزول	Trance –Incensole isomer	۱۷/۹۰	۲۳/۷	C20H40O
۶	سمبرنول	Cembrenol	۱۷/۷۷	۲/۳۱	C20H34O
۷	سمبرن A	Cembrene A	۱۶/۰۰	۱/۰۸	C20H32
۸	ترانس-نورورسا-دی ان	12-diene،Trance -24-Norursa-3	۱۶/۴۳	۵/۲	C29H46
۹	سیس-نورورسا-دی ان	12-diene،Cis-24-Norursa-3	۱۶/۴۶	۴/۴۳	C29H46
۱۰	نورورسا-دی ان-۱۱-اون	12-dien-11-one،24-Norursa-3	۲۶/۴۱	۱۱/۷۷	C29H44O

که پیش‌تر برای تعادل در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گذاشته‌شده بود و پس از ایجاد چند برش در دم اپیدیدیم برای خروج اسپرم‌ها، در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از ۴۵ دقیقه، اسپرم‌ها خارج و در محیط پخش گردیدند.

ارزیابی تحرک اسپرم: برای این منظور، نمونه اسپرم‌ها به میزان ۱ به ۱۰ رقیق‌سازی شدند. برای تعیین درصد تحرک، ۱۰۰ خانه از ۲۵ میدان میکروسکوپی به شکل تصادفی انتخاب و حرکت اسپرم‌ها ارزیابی گردید؛ سپس میانگین آن‌ها بر اساس درصد تحرک ثبت شد (۳۱، ۳۰).

بررسی غلظت اسپرم: برای شمارش اسپرم‌ها، رقت یک به ۲۰ از اسپرم یادشده تهیه گردید، به این صورت که در یک میکروتیوب یک میلی‌لیتری، ۱۹۰ میکرولیتر آب مقطر ریخته و سپس به آن ۱۰ میکرولیتر از اسپرم مدنظر اضافه شد و بعد ۱۰ میکرولیتر از محلول مدنظر برداشته و روی لام نئوبار ریخته شد که لامل از قبل روی آن قرار داده‌شده بود. برای شمارش تعداد اسپرم‌ها از روش استاندارد لام هموسایتومتری استفاده گردید (۳۱، ۳۰).

بررسی قدرت زنده‌مانی اسپرم: برای ارزیابی قدرت زیست‌پذیری اسپرم، از تست ائوزین-نگروزین استفاده شد که مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم مدنظر روی یک لام تمیز با ۲۰ میکرولیتر از محلول ائوزین مخلوط گردید و پس از گذشت ۲۰ الی ۳۰ ثانیه، ۲۰ میکرولیتر از محلول رنگی نگروزین به آن اضافه شد و پس از تهیهٔ اسمیر از محلول مدنظر و خشک شدن لام‌ها، با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگ‌نمایی ۴۰-۱۰ درصد،

اسپرم‌های زنده (بی‌رنگ) و اسپرم‌های مرده (رنگ‌گرفته) بررسی گردید (۳۰).

ارزیابی مورفولوژیک اسپرم: برای ارزیابی مورفولوژیک اسپرم‌ها، از رنگ‌آمیزی آنیلین بلو استفاده شد، به این صورت که اسپرم‌هایی که ظاهر غیرطبیعی داشتند، شمارش و نتایج بر اساس درصد بیان گردید. برای ارزیابی دقیق‌تر و همچنین تشخیص بقایای سیتوپلاسمیک که نشان از بلوغ نیافتن مورفولوژیک اسپرم‌ها دارد، رنگ‌آمیزی ائوزین – نگروزین نیز استفاده شد. آن دسته از اسپرم‌هایی که حاوی بقایای سیتوپلاسمی بودند، به‌عنوان اسپرم‌های نابالغ (از لحاظ مورفولوژیک) در نظر گرفته شدند. هرگونه اختلال در شکل ظاهری اسپرم، گردن و دم آن و وجود باقیمانده‌های سیتوپلاسمی به‌عنوان مورفولوژی غیرطبیعی محسوب گردید. اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی، شمارش و به‌صورت درصد بیان شد (۳۱).

روش تجزیه‌وتحلیل آماری: برای تحلیل آماری داده‌های به‌دست‌آمده از نرم‌افزار SPSS vol.20 و روش آماری ANOVA و تست دانکن با سطح آماری $P\leq0.05$ استفاده گردید و به‌صورت میانگین و خطای استاندارد (S.E.M) بیان شد.

یافته ها

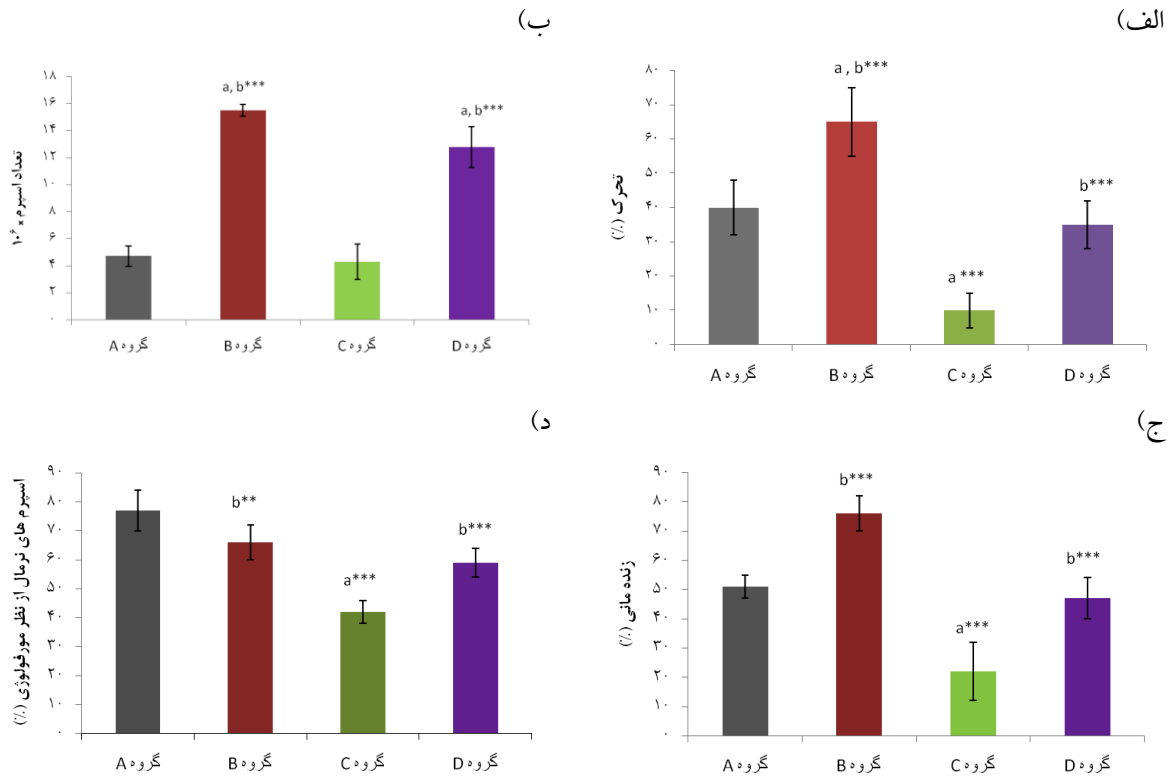
وزن بدن و بیضهٔ موش‌ها: ارتباط معناداری در وزن بدن موش‌های گروه‌های مختلف در ابتدا و انتهای انجام آزمایش دیده نشد ($P>0.05$)؛ همچنین ارتباط معنی‌داری در وزن بیضه‌های گروه‌های مختلف مشاهده نگردید ($P>0.05$) (جدول شمارهٔ ۲) وضعیت تحرک اسپرم: درصد اسپرم‌های متحرک در گروه‌های مطالعه‌شده با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد. اختلاف معناداری در تحرک میان گروه سیس‌پلاتین+کندر و گروه کندر، نسبت به گروه سیس‌پلاتین وجود داشت ($P<0.001$)؛ همچنین تحرک اسپرم‌ها به‌طور معناداری در گروه سیس‌پلاتین در مقایسه با گروه کنترل کمتر بود ($P<0.001$)؛ اما اختلاف معنی‌داری در تحرک میان گروه سیس‌پلاتین+کندر نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد ($P>0.05$) (شکل شماره ۲ الف).

غلظت اسپرم: شمارش اسپرم‌ها زیر لام نئوبار به‌منظور ارزیابی طبیعی بودن تعداد اسپرم‌ها، توسط میکروسکوپ نوری صورت گرفت و تعداد اسپرم‌ها شمارش گردید. اختلاف معنی‌داری در میزان غلظت اسپرم میان گروه‌های کندر+سیس‌پلاتین و کندر به‌تنهایی در مقایسه با گروه سیس‌پلاتین و میان گروه سیس‌پلاتین+کندر و گروه کندر در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ($P<0.001$)؛ اما اختلاف معناداری در میزان غلظت اسپرم میان گروه سیس‌پلاتین نسبت به گروه کنترل و میان گروه سیس‌پلاتین+کندر نسبت به گروه کندر دیده نشد ($P>0.05$) (شکل شمارهٔ ۲. ب).

قدرت زنده‌مانی اسپرم: اسپرم‌های مرده که در روش رنگ‌آمیزی ائوزین – نگروزین رنگ گرفته بودند، در چهار گروه یادشده شمارش و درصد آن‌ها به‌دست آمد که اختلاف معنی‌داری در درصد قدرت زنده‌مانی اسپرم‌ها میان سایر گروه‌ها، در مقایسه با گروه سیس‌پلاتین وجود داشت، به‌طوری‌که درصد قدرت زنده‌مانی اسپرم‌ها در گروه سیس‌پلاتین در مقایسه با سایر گروه‌ها، به‌صورت معناداری پایین‌تر بود ($P<0.001$) (شکل شمارهٔ ۲. ج).

جدول شمارهٔ ۲. مقایسهٔ میانگین وزن بدن در ابتدا و انتهای آزمایش و وزن بیضه در گروه‌های مختلف مطالعه‌شده

گروه‌های مطالعه‌شده	وزن بدن در ابتدای آزمایش (گرم)	وزن بدن در انتهای آزمایش (گرم)	وزن بیضه (گرم)
کنترل	۳۰/۷۵±۰/۶۷	۲۶/۹۰±۱/۱۴	۰/۰۷۱±۰/۰۱۰
کندر	۳۰/۸۷±۰/۷۱	۲۹/۵۰±۲/۰۵	۰/۰۸۷±۰/۰۰۸
سیس‌پلاتین	۲۹/۰۶±۲/۱۰	۳۰/۵۵±۲/۰۲	۰/۰۷۷ ±۰/۰۰۸
سیس‌پلاتین+کندر	۳۲/۳۷±۰/۵۹	۳۳/۸۴±۰/۹۸	۰/۱۰۳±۰/۰۰۷



شکل شمارهٔ ۲. مقایسهٔ درصد تحرک (الف)، غلظت (ب)، درصد زنده‌مانی (ج) و مورفولوژی اسپرم‌ها در گروه‌های مطالعه‌شده. گروه A. گروه کنترل، گروه B. گروه کندر، گروه C. گروه سیس‌پلاتین، گروه D. سیس‌پلاتین+کندر. علامت a نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار گروه‌های مطالعه‌شده با گروه کنترل است. علامت b نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار گروه‌های مطالعه‌شده با گروه سیس‌پلاتین است. علامت *** نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار $P<0.001$ و علامت ** نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار $P<0.01$ است.

مورفولوژی اسپرم: اختلاف معنی‌داری در مورفولوژی اسپرم‌ها در گروه سیس‌پلاتین+کندر ($P<0.001$) و کندر ($P=0.006$) در مقایسه با گروه سیس‌پلاتین مشاهده گردید؛ اما اختلاف معنی‌داری در مورفولوژی اسپرم‌ها میان گروه سیس‌پلاتین+کندر و کندر نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد ($P>0.05$) (نمودار شکل شمارهٔ ۲. د).

بحث و نتیجه‌گیری

هدف مطالعهٔ حاضر بررسی تأثیر محافظتی کندر روی مؤلفه‌های اسپرم متعاقب شیمی‌درمانی در موش سوری، با استفاده از سیس‌پلاتین بود. نتایج مطالعهٔ حاضر نشان داد که سیس‌پلاتین موجب کاهش کیفیت اسپرم در موش سوری می‌شود که استفاده از کندر می‌تواند باعث مهار آثار مخربی سیس‌پلاتین بر کیفیت اسپرم گردد. اسپرم در اثر استفاده از سیس‌پلاتین، دچار تغییر شکل می‌شود و به ایجاد شکل‌های غیرطبیعی، القای مرگ سلولی، ایجاد اسپرم‌های غیرطبیعی و کاهش حرکت روبه‌جلو در آن منجر می‌گردد (۳۲). طبق مطالعهٔ کشتمند و همکاران در سال ۲۰۱۴، بر مرفولوژی اسپرم در موش مشخص شد که مصرف سیس¬پلاتین باعث کاهش تعداد اسپرم‌ها و وزن اپیدیدیم می‌شود (۳۳). ترک و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که سیس‌پلاتین موجب کاهش وزن بیضه، اپیدیدیم و وزیکول سمینال در موش‌های صحرایی می‌گردد (۳۴). در تطابق با این مطالعات، در این پژوهش نشان داده شد که در گروهی که سیس‌پلاتین مصرف گردید، به‌طور معناداری درصد تحرک، زنده‌مانی و غلظت اسپرم‌ها در مقایسه با دیگر گروه‌ها کاهش و اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی افزایش پیدا کرد که می‌تواند احتمالاً به علت خاصیت القای مرگ سلولی توسط سیس‌پلاتین باشد. مطالعات نشان دادند که آثار سمی

سیس‌پلاتین از طریق القای آسیب سلول‌های سرتولی ایجاد می‌شود که درنهایت، موجب آسیب سلول‌های جنسی می‌گردد. از سویی، گزارش‌شده است که سیس‌پلاتین هم به روش مستقیم، یعنی اثر روی سلول‌های جنسی و مرگ آن‌ها به روش آپوپتوز و هم به روش غیرمستقیم، از طریق آسیب به سلول‌های سرتولی و تغییر در تکامل، تمایز و آزادسازی سلول‌های اسپرماتوزوآ می‌تواند اثرگذار باشد (۳۵). مطالعات دیگری نشان داده است که ازجمله عواملی که موجب ایجاد اسپرم به شکل‌های غیرطبیعی در زمان مصرف سیس‌پلاتین می‌شود، انباشته شدن رادیکال‌های آزاد و پراکسید شدن اسیدهای چرب مهم دخالت‌کننده در مورفولوژی و تحرک اسپرم است (۳۷-۳۵). با وجود استفادهٔ وسیع از سیس‌پلاتین در شیمی‌درمانی، دربارهٔ چگونگی حفظ اسپرماتوژنز در برابر آثار سوء آن مطالعات اندکی وجود دارد.

در سال‌های اخیر، تحقیقات بسیاری در ارتباط با آثار گیاهان مختلف بر باروری پستانداران و بافت بیضه انجام‌شده است. در مطالعات متعددی گزارش‌شده است که عصارهٔ گیاهانی نظیر زعفران، شاه‌تره، سیر، مرزنجوش و زنجبیل سبب افزایش تعداد اسپرم و تحرک آن با تأثیر در فرایند اسپرماتوژنز گردیده است (۲۱) همچنین نوسیر و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش داده‌اند تجویز عصارهٔ صمغ کندر، توانایی باروری در موش صحرایی نر را افزایش می‌دهد (۲۱). در تطابق با آن، نتایج مطالعهٔ حاضر نیز نشان داد درصد تحرک اسپرم‌ها به‌طور معناداری، در گروهی که عصارهٔ کندر به‌تنهایی و همچنین به همراه سیس‌پلاتین مصرف شد، در مقایسه با گروه کنترل و گروهی که سیس‌پلاتین به‌تنهایی استفاده شد، افزایش داشت که نشان‌دهندهٔ آثار بهبودی کندر بر اسپرم و تحرک آن است. مطالعات نشان می‌دهد که احتمال دارد آثار عصارهٔ کندر، از طریق ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و صمغ رزینی موجود در کندر باشد که سبب افزایش تحرک و تعداد اسپرم و ترشح هورمون‌های محور هیپوفیز – بیضه ازجمله تستوسترون می‌شود (۳۹، ۳۸). با توجه به نقش مهم هورمون تستوسترون در روند اسپرماتوژنز، آشکار است که در صورت افزایش این هورمون، تعداد اسپرم‌ها افزایش می‌یابد.

از سوی دیگر، احتمال می‌رود کندر به‌طور غیرمستقیم، موجب افزایش ترشح هورمون‌های تحریک‌کنندهٔ گنادوتروپین از هیپوتالاموس و به دنبال آن، افزایش ترشح هورمون‌های گنادوتروپین از هیپوفیز قدامی و درنتیجه، افزایش تستوسترون شود که به دنبال آن، تعداد اسپرم‌ها افزایش می‌یابد (۳۵). نتایج مطالعهٔ حاضر نیز مؤید افزایش معنادار تعداد اسپرم‌ها پس از تیمار با کندر است، به‌طوری‌که در گروه سیس‌پلاتین+کندر و گروهی که کندر دریافت کردند، در مقایسه با گروه‌های کنترل و سیس‌پلاتین، به‌طور معناداری تعداد اسپرم‌ها افزایش پیدا کرد. نتایج مطالعهٔ ما نشان داد که کندر باعث افزایش تعداد اسپرم می‌شود. در تطابق با مطالعهٔ حاضر، در تحقیقی گزارش‌شده است که صمغ رزینی عصارهٔ آبی کندر در موش صحرایی نر، افزایش فراوانی در شاخص‌های باروری ازجمله درصد تحرک، تعداد اسپرم و میزان تستوسترون سرم می‌گردد که نشانگر مناسب بودن این مادهٔ گیاهی برای افزایش شانس باروری است (۱۵)؛ همچنین نشان داده شد که تجویز دهانی عصارهٔ آبی کندر توانایی باروری در موش‌های صحرایی نر و همچنین وزن بدن موش‌ها را افزایش می‌دهد که از لحاظ افزایش وزن بدن با نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق هم‌خوانی ندارد؛ زیرا در این مطالعه نشان داده شد که مصرف کندر اثری بر وزن بدن ندارد (۱۵). طی مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ انجام گرفت، تجویز دهانی صمغ رزینی کندر به موش‌های آزمایشگاهی نر افزایش معنی‌داری در وزن بیضه‌ها، اپیدیدیم، تحرک و تعداد اسپرم، تعداد سلول‌های لایدیگ، تعداد سلول‌های لایهٔ زایندهٔ لوله‌ی منی‌ساز (Germ cells)، میزان هورمون محرک فولیکولی (FSH)، تعداد محل‌های جایگزینی جنین در رحم موش ماده و میزان هورمون تستوسترون را نشان داد (۲۱)؛ بنابراین، این عصاره ممکن است با عمل بر غدهٔ هیپوفیز، باعث افزایش هورمون‌های جنسی شود؛ همچنین با توجه به اینکه فرایند اسپرم‌زایی و عملکرد اندام‌های تولیدمثلی وابسته به هورمون‌های جنسی است، این فرایند می‌تواند سبب افزایش

عملکرد جذبی و ترشحی بیضه و اپیدیدیم گردد. این ویژگی می‌تواند توجیه‌کنندهٔ افزایش میزان هورمون تستوسترون سرم، میزان ذخیرهٔ اسپرم اپیدیدیمی و میزان تولید روزانهٔ اسپرم توسط بیضه‌ها باشد.

مشاهدات ما در این مطالعه نشان داد که سیس‌پلاتین موجب کاهش میزان غلظت، تحرک، زنده‌مانی و آسیب به مورفولوژی اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل گردید؛ اما در گروه‌های تیمارشده با کندر نسبت به گروه کنترل و گروهی که با سیس‌پلاتین تیمارشده بودند، میزان شاخص‌های یادشده به‌طور چشمگیری افزایش یافته بود و هیچ‌گونه اثری از آسیب‌های سیس‌پلاتین بر اسپرم در مؤلفه‌های یادشده مشاهده نگردید. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده می‌توان ارزیابی کرد که عصارهٔ آبی کندر می‌تواند به‌طور چشمگیری از آثار منفی شیمی‌درمانی با سیس‌پلاتین بر روند اسپرماتوژنز بکاهد و سبب بهبود کیفیت، غلظت، تحرک، زنده‌مانی و کیفیت مورفولوژیکی و به‌طورکلی مؤلفه‌های کیفی اسپرم شود. البته برای شناخت دقیق‌تر سازوکارهایی که کندر آثار منفی سیس‌پلاتین بر کیفیت اسپرم را کاهش می‌دهد، به مطالعات بیشتری نیاز است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در محل دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز انجام شد. نویسندگان مراتب قدردانی خود را اعلام می‌نمایند.

کد اخلاق: 10210501972004

References

1. Amin A, Buratovich MA. New platinum and ruthenium complexes-the latest class of potential chemotherapeutic drugs-a review of recent developments in the field. Med Chem. 2009; 9:1489-503. doi:10.2174/138955709790361566
2. Cherry SM, Hunt PA, Hassold TJ. Cisplatin disrupts mammalian spermatogenesis, but does not affect recombination or chromosome segregation. Mutat Res Genet Toxicol Environ. 2004;564:115-28. doi: 10.1016/j.mrgentox.2004.08.010.
3. Florea A-M, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. Cancers .2011;3:1351-71. doi: 10.3390/cancers3011351.
4. Ishikawa T, Kamidono S, Fujisawa M. Fertility after high-dose chemotherapy for testicular cancer. Urology. 2004;63:137-40. doi: 10.1016/j.urology. 2003.08.029.
5. Martin RH, Ernst S, Rademaker A, Barclay L, Ko E, Summers N. Analysis of sperm chromosome complements before, during, and after chemotherapy. Cancer Genet Cytogenet. 1999;108:133-6. doi: 10.1016/S0165-4608(98)00125-3.
6. Kartalou M, Essigmann JM. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. Mutat Res Genet Toxicol Environ. 2001;478:1-21. doi: 10.1016/S0027-5107(01)00142-7.
7. Pabla N, Huang S, Mi Q-S, Daniel R, Dong Z. ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. J Biol Chem. 2008;283:6572-83. doi: 10.1074/jbc.M707568200.
8. Katoh C, Kitajima S, Saga Y, Kanno J, Horii I, Inoue T. Assessment of quantitative dual-parameter flow cytometric analysis for the evaluation of testicular toxicity using cyclopho-sphamide-and ethinylestradiol-treated rats. J Toxicol Sci. 2002;27:87-96. doi: 10.2131/jts.27.87.
9. Pandya C, Pillai P, Nampoothiri L, Bhatt N, Gupta S, Gupta S. Effect of lead and cadmium co-exposure on testicular steroid metabolism and antioxidant system of adult male rats. Andrologia. 2012;44:813-22. doi: 10.1111/j. 1439-0272.2010.01137.x
10. Reddy KP, Madhu P, Reddy PS. Protective effects of resveratrol against cisplatin-induced testicular and epididymal toxicity in rats. Food Chem Toxicol. 2016;91:65-72.
11. Fung C, Vaughn DJ. Complications associated with chemotherapy in testicular cancer management. Nat Rev Urol. 2011;8:213. doi: 10.1016/j.fct.2016.02.017.
12. Hooser SB, van Dijk-Knijnenburg WC, Waalkens-Berendsen ID, Smits-van Prooije AE, Snoeij NJ, Baan RA, et al. Cisplatin–DNA adduct formation in rat spermatozoa and its effect on fetal development. Cancer lette. 2000;151:71-80. doi: 10.1016/S0304-3835:9900415-2.
13. Ang H, Chan K, Gan E, Yuen K. Enhancement of sexual motivation in sexually naive male mice by Eurycoma longifolia. Int J Pharmacogn. 1997;35:144-6. doi: 10.1076/phbi.35.2.144.13283
14. 14. Harnack LJ, Rydell SA, Stang J, editors. Prevalence of use of herbal products by adults in the Minneapolis/St Paul, Minn, metropolitan area. Mayo Clin Proc 2001; Elsevier. doi: 10.4065/76.7.688
15. Parandin R, Sadeghipour Rodsari HR, Shamili S, Ghasempour HR. efects of Aqueous Extract of Boswellia Thurifera on Fertility in Male Rats. J Adv Med Biomed Res. 2008;65:23-30. (Persian)
16. Cheraghi J, Kridhchi P, Nasri S, Zargooshi M. effects of parsley (Petroselinum Crispum) hydroalcoholic extract on spermatogenesis and Pituitary-Gonadal axis in streptozotocin-induced diabetic male rat Cheraghi Javad, Kerishchi Khyabani Parisa, Nasri Sima, Zargushi Maryam. Iran J Vet Med. 2021;15:411-22. doi:

10.22059/IJVM.2021.312948.1005139.
17. Irais CM, Claudia BR, David PE, Ashutosh S, Rubén GG, Agustina RM, et al. Leaf and Fruit Methanolic Extracts of Azadirachta indica Exhibit Antifertility Activity on Rats' Sperm Quality and Testicular Histology. Curr Pharm Biotechnol. 2021;22:400-7 doi: 10.2174/1389201021666200730145621.
18. Mahmoudi A, Hosseini-Sharifabad A, Monsef-Esfahani HR, Yazdinejad AR, Khanavi M, Roghani A, et al. Evaluation of systemic administration of Boswellia papyrifera extracts on spatial memory retention in male rats. J Nat Med. 2011;65:519-25. doi: 10.1007/s11418-011-0533-y.
19. Marshall S. Frankincense: festive pharmacognosy. Pharm J. 2003;271: 862–4.
20. Pandey RS, Singh BK, Tripathi YB. Extract of gum resins of Boswellia serrata L. inhibits lipopolysaccharide induced nitric oxide production in rat macrophages along with hypolipidernic property. indian gournal of experimental biology.2005; 43: 509-16.
21. Nusier MK, Bataineh HN, Bataineh ZM, Daradka HM. Effect of Frankincense (boswellia thurifera) on reproductive system in adult male rat. J health sci. 2007;53:365-70. doi: 10.1248/jhs.53.365
22. Asefifar F, Shams J and Zaringhalam J. Comparing the effect of Boswellia serrata and Lavandula angustifolia extract administration with the placebo on improvement of premature ejaculation during methadone treatment of opioid. J Med Plants. 2016;15:99-109. (Persian)
23. Dashti GH, Esfandiari E, Nematbagksh M, Sanei MH, Afsharipoor S, Farzan A, Jaafari Barmak M.The Effect of Frankincense Extract on Accumulation of Fatty Streaks in Coronary Arteries of High-Cholesterol Fed Male Rabbits. J Arm Danesh. 2005;22:1-12. (Persian)
24. Keshtmand Z, Oryan S, Ghanbari A, Khazaei M. Protective effect of Tribulus terrestris hydroalcoholic extract against cisplatin-induced cytotoxicity on sperm parameters in male mice. Int J Morphol. 2014;32:551-7.
25. Keshtmand Z. Protective effects of tribulus terrestris hydroalcoholic extract against cisplatin-induced germ cell apoptosis in male mice. Int j morphol. 2018;36:140-4.
26. Keshtmand Z, Ghanbari A, Khazaei M, Rabzia A. Protective Effect of Tribulus terrestris Hydroalcoholic Extract Against Cisplatin-Induced Apoptosis on Testis in Mice. Int j morphol. 2015;33:279-84.
27. Sadeghi F, Khalaj-Kondori M, Feizi H, Shaikhzadeh Hesari F. The Effect of Aqueous Extract of Boswellia on Learning and Spatial Memory in Adult Male Rats. J Zanjan Uni Med. 2014;22: 122-31. (Persian)
28. Shams J, Asefifar F, Zaringhalam J, Rezazadeh Sh. The Effects of Boswellia serrata and Lavandula angustifolia Extracts Administration on Improving Erection Dysfunction Following Opioid Dependence. J Med Plant. 2017;16:34-46. (Persian)
29. Zaringhalam J, Shams J, Rezazadeh S, Manaheji H, Akhondzadeh S, Asefifar F. Role of the methanolic extracts of Boswellia serrata and Lavandula angustifolia on apomorphine induced ejaculation in male Wistar rats. J Med Plant. 2010;4:1073-80. (Persian)
30. Organization WH. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.
31. Scott-Wilson J. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. J R Soc Med. 1982;75:58.
32. Gandini L, Sgrò P, Lombardo F, Paoli D, Culasso F, Toselli L, et al. Effect of chemo-or radiotherapy on sperm parameters of testicular cancer patients. Hum Reprod. 2006;21:2882-9. doi: 10.1093/humrep/del167
33. Keshtmand Z, Oryan Sh, Ghanbari A, Khazaee M. Protective Effect of Hydroalcoholic Extract Tribulus terrestris on Cisplatin Cytotoxicity on Sperm Viability and Count in Mice. J Med Plant. 2014;52:66-73. (Persian)
34. Türk G, Ateşşahin A, Sönmez M, Çeribaşi AO, Yüce A. Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. Fertil Steril. 2008;89:1474-81. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.04.059.
35. Rezvanfar MA, Rezvanfar MA, Shahverdi AR, Ahmadi A, Baeeri M, Mohammadirad A, et al. Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity, DNA damage and chromatin abnormality by selenium nano-particles. Toxicol Appl Pharmacol. 2013;266:356-65. doi: 10.1016/j.taap.2012.11.025
36. Fekry E, Rahman A, Awny MM, Makary S. Protective effect of mirtazapine versus ginger against cisplatin-induced testicular damage in adult male albino rats. Ultrastruct Pathol. 2019;43:66-79. doi: 10.1080/01913123.2019.1592269
37. Oigbochie V, Lawal T, Ekpruke C. Effect of Human Menopausal Gonadotropin on Rat Testes Damaged by Cisplatin Treatment. African Scientist. 2017;18:33-42.
38. Efferth T, Oesch F, editors. Anti-inflammatory and anti-cancer activities of frankincense: Targets, treatments and toxicities. Seminars in cancer biology. 2020; Article in press Elsevier. doi: 10.1016/j.semcancer.2020.01.015.
39. Gupta I, Gupta V, Parihar A, Gupta S, Lüdtke R, Safayhi H, et al. Effects of Boswellia serrata gum resin in patients with bronchial asthma: results of a double-blind, placebo-controlled, 6-week clinical study. Eur J Pharm Med Res.1998;3:511-4.