Research Paper

The effect of diosgenin on mitochondrial membrane potential and neutrophil infiltration in methotrexate-induced testicular injury in rats

Fatemeh Taleahmad[1], Mohsen Khalili[2], Narges HadadZadeh[1], Ensyie Joneidi[3], Mehrdad Roghani[2*]

1. Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
2. Neurophysiology Research Center, Shahed University, Tehran, Iran
3. Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

*** Corresponding author e-mail: mehjour@yahoo.com**

Citation: Taleahmad F, Khalili M, HadadZadeh N, Joneidi E, Roghani M. The effect of diosgenin on mitochondrial membrane potential and neutrophil infiltration in methotrexate-induced testicular injury in rats. Daneshvar Medicine 2022; 30(1): 27-35.
doi: 10.22070/DANESHMED.2022.15053.1116

Abstract

Background and Objective: Methotrexate can induce testicular tissue damage and infertility by increasing the activity myeloperoxidase and destroying mitochondrial membrane. Diosgenin is a steroidal sapogenin with antioxidant properties. The aim of this study was to evaluate the effects of diosgenin on mitochondrial membrane potential (MMP) and neutrophil infiltration in methotrexate-induced testicular injury in the rat.

Materials and Methods: 40 rats were divided into 5 groups: control, diosgenin-treated control with a dose of 50 mg/kg, methotrexate, two groups of diosgenin-treated methotrexate at doses of 10 or 50 mg/kg. Methotrexate at a dose of 20 mg/kg was injected intraperitoneally one day after diosgenin administration. Diosgenin was administered daily for two weeks at doses of 10 or 50 mg/kg. At the end, the rats were anesthetized and the testis was removed. MPO and MMP in testicular tissue were measured. For statistical analysis, one-way ANOVA and Tukey post-test were used.

Results: The MMP of the methotrexate group showed a significant decrease compared to the control group (p=0.003). The diosgenin-treated methotrexate group at a dose of 50 mg/kg showed a significant increase as compared to the methotrexate group (p=0.008). The level of MPO in the methotrexate group showed a significant increase as compared to the control group (p=0.009). The diosgenin-treated methotrexate group at a dose of 50 mg/kg showed a significant decrease as compared to the methotrexate group (p=0.039).

Conclusion: Diosgenin reduces the harmful effects of methotrexate on MPO and MMP in testicular tissue.

Keywords: Diosgenin, Methotrexate, Neutrophilic infiltration, Mitochondrial membrane potential, Testis

Received: 19 Dec 2021
Last revised: 09 Apr 2022
Accepted: 19 Apr 2022

مقاله پژوهشی

اثر دیوسجنین بر پتانسیل غشای میتوکندری و انفیلتراسیون نوتروفیلی در آسیب بیضه القاء شده با متوترکسات در موشهای بزرگ آزمایشگاهی

نویسندگان: فاطمه طالع احمد[۱]، محسن خلیلی[۲]، نرگس حداد زاده نیری[۱]، انسیه جنیدی[۳]، مهرداد روغنی[۲*]

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳. دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: مهرداد روغنی Email: mehjour@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف: متوترکسات با افزایش آنزیم میلو پراکسیداز و تخریب غشای میتوکندری سبب آسیب بافت بیضه و ناباروری می شود. دیوسجنین یک ساپوژنین استروئیدی با خواص آنتی اکسیدانی می باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات دیوسجنین بر تغییرات پتانسیل غشای میتوکندری و انفیلتراسیون نوتروفیلی در آسیب بیضه با متوترکسات در موش بزرگ آزمایشگاهی می باشد.

مواد و روش ها: تعداد ۴۰ سر موش به ۵ گروه کنترل، کنترل تحت تیمار دیوسجنین دوز mg/kg۵۰ و متوترکسات و دو گروه متوترکسات تیمار شده دیوسجنین با دوزهای ۱۰ و ۵۰ mg/kg تقسیم شدند. متوترکسات با دوز ۲۰ mg/kg یک روز بعد از تجویز دیوسجنین بطور داخل صفاقی تزریق گردید. دیوسجنین روزانه به مدت دو هفته با دوزهای ۱۰ و ۵۰ mg/kg تجویز دهانی شد. در پایان کار، موش ها بیهوش و بیضه ها جدا شدند. فعالیت میلوپراکسیداز و پتانسیل غشای میتوکندری در هموژنه بافت بیضه سنجش شد. برای آنالیز آماری از آنووای یکطرفه و تست تعقیبی توکی استفاده شد.

نتایج: پتانسیل غشای میتوکندری گروه متوترکسات نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری نشان داد (p=0.003). و در گروه متوترکسات تیمار شده با دیوسجنین با دوز mg/kg۵۰ نسبت به گروه متوترکسات افزایش معنی داری نشان داد (p=0.008). میزان میلوپراکسیداز گروه متوترکسات نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری نشان داد (p=0.009) و در گروه متوترکسات تیمار شده با دیوسجنین دوز ۵۰ mg/kg نسبت به گروه متوترکسات کاهش معنی داری نشان داد (p=0.039).

نتیجه گیری: دیوسجنین سبب کاهش عوارض ناشی از آسیب متوترکسات بر فعالیت میلوپراکسیداز و پتانسیل غشای میتوکندری بافت بیضه می شود.

واژه های کلیدی: دیوسجنین، متوترکسات، انفیلتراسیون نوتروفیلی، پتانسیل غشای میتوکندری، بیضه

دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۸
آخرین اصلاح‌ها: ۱۴۰۱/۰۱/۲۰
پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۳۰

مقدمه

متوترکسات[1] ترکیبی است که در درمان طیف گستردهایی از بدخیمیها مورد استفاده قرار میگیرد (۱). مطالعات نشان داده است که متوترکسات با افزایش متابولیت های اکسیژن به نام اکسیژن فعال موجب تخریب ساختار غشای سلول میشود و سبب مهار فعالیتهای آنزیمی و افزایش روند استرس اکسیداتیو[2] میشود (۲). متوترکسات با ایجاد عوارض جانبی حاد سمی در بافتهای حاوی سلولهای تقسیم سریع، باعث افزایش لیپید پراکسیداز سلولی شده که منجر به استرس اکسیداتیو میشود (۳). همچنین مطالعات نشان داده است که متوترکسات باعث افزایش سطح (MDA) پلاسما شده، و سطح (SOD)[3] و سطح کاتالاز[4] را کاهش داده و باعث کاهش وزن بدن میشود (٤،٥). متوترکسات با از بین بردن تعادل بین پراکسیدازها و آنتیاکسیدانها باعث افزایش میزان پرولیفراسیون[5] و انفیلتراسیون نوتروفیلی، استرس اکسیداتیو، التهاب و فاکتورهای آپوپتوز میشود. متوترکسات با افزایش فضای بینابینی بافت بیضه، ایجاد ادم و اختلال شدید اپیتلیوم سمنیفر و کاهش قطرلولهها و کاهش وزن بیضهها سبب اسپرماتوژنز ناقص میشود که منجر به ناباروری میشود (٦،٧). ناباروری[6] با ایجاد اختلال در روند تولید مثل بعنوان یک مشکل شایع در جوامع بشری مطرح میباشد، که یکی از مهمترین بحرانهای زندگی هست که منجر به بروز مشکلات روحی و روانی برای افراد مبتلا میگردد (۸). استفاده از ترکیبات آنتیاکسیدانی[7] و ضد التهابی در درمان ناباروری موثر میباشد. در این رابطه دیوسجنین[8] بعنوان یک ساپوژنین استروئیدی که به شکل گلیکوزید در گیاهانی مانند شنبلیله و زغال اخته و ساقه زیر زمینی گیاه یام یافت میشود. و در سنتز مشتقات استروئیدی و هورمونهای جنسی در داروسازی مورد استفاده قرار میگیرد (۹). مطالعات نشان میدهد که دیوسجنین اثر سودمندی بر استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکالهای آزاد اکسیژن دارد و میتواند در درمان ناباروری مردان موثر باشد (۱۰). همچنین مطالعات نشان داده است که دیوسجنین میتواند به طور قابل توجهی سطح انسولین و تستوسترون سرم را بهبود بخشد و فاکتورهای التهابی (IL-6) و (TNFα) کاهش پیدا کرد. همچنین مطالعات نشان داده است که دیوسجنین علاوه بر جلوگیری از آسیب به توبولهای سمینیفر در موشهای دیابتی سبب افزایش تعداد و میزان تحرک اسپرمها شد (۱۱). مطالعات نشان داده است که دیوسجنین در کاهش فشار خون بالا و قند خون بالا موثر بوده و دارای فعالیت ضد التهابی و ضد اضطرابی میباشد و خاصیت آنتیاکسیدانی دارد (۱۲). همچنین دیوسجنین بیان فاکتور نکروز تومور-آلفا (TNF-α)، اینترلوکین ۱- بتا (IL-1 β) در سرم و فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز (MPO) در میوکارد را به طور قابل توجهی کاهش داده و با تنظیم و فعال سازی مسیرهای (p 38- MAP) و (JNK) فسفوریلاسیون فاکتور رونویسی (NF-κB) را مهار کرده و خاصیت ضد التهابی دارد (۱۳). در مطالعه سلولهای سرطانی معده دیوسجنین با مهار تکثیر سلولی و مهاجرت سلولی و تاثیر در آنزیم (ENH_2) در درمان سلولهای سرطانی اثرات سودمندی را نشان داد (١٤). همچنین دیوسجنین با مهار (cdc20) در سلولهای پوکی استخوان با مهار رشد سلولهای تومور و با ایجاد آپوپتوز در این سلولها در درمان بیماران مبتلا به استئوسارکوم[9] اثرات مفیدی را نشان داد (١٥،١٦). تاکنون در مورد اثرات دیوسجنین بر آسیب بیضه با متوترکسات پژوهشی انجام نگرفته است. در این مطالعه اثر دیوسجنین بر تغییرات پتانسیل غشای میتوکندری و انفیلتراسیون نوتروفیلی در آسیب بیضه با متوترکسات در موش بزرگ آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

1- Methotrexate
2- Oxidative strees
3- Superoxide dismutase
4- Catalase
5- Proliferation
6- Fertility
7- Antioxidants
8- Diosgenin
9- Osteosarcoma

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش تعداد ٤٠ سر موش نر نژاد ویستار، در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم خریداری شد، و در مرکز مطالعات حیوانی دانشگاه شاهد با درجه حرارت 21±20 سانتی‌گراد، رطوبت ٤٠-۳٠٪ و سیکل تاریکی- روشنایی ۱۲ ساعته، نگهداری شدند. آب و غذای استاندارد بدون هیچ محدودیتی در اختیار آنها قرار گرفت. موشها به طور تصادفی به ۵ گروه کنترل، کنترل تحت تیمار با دیوسجنین به میزان ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، متوترکسات و دو گروه متوترکسات تیمار شده دیوسجنین با دوزهای ۱۰ و۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم طبقه بندی شدند. متوترکسات با دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به شکل داخل صفاقی تزریق گردید (٤). دیوسجنین روزانه به مدت دو هفته از یک روز قبل از تزریق متوترکسات به شکل گاواژ با دوزهای ۱۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن تجویز شد. در پایان، پس از دو هفته گاواژ، با حفظ شرایط اخلاقی موشها بیهوش شده و بیضه ها جدا و توزین شدند. فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز (MPO) به عنوان مارکر اختصاصی انفیلتراسیون نوتروفیلی و میزان تغییرات پتانسیل غشای میتوکندری (MMP) به عنوان شاخص سلامت میتوکندری در هموژنه بافت بیضه سنجش شدند.

تهیه هموژنه بافتی

مخلوط هموژنه بافتی ۱۰ درصد در محلول لیز تریس هیدروکلراید ۱۵۰ میلی مولار تهیه شد و با استفاده از دستگاه هموژنه کننده مخلوط شد و سوسپانسیون به دست آمده با حفظ زنجیره سرمایی به سانتریفیوژ یخچال دار منتقل شد و با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت به دست آمده به وسیله سمپلر از رسوبات جدا شد و به میکروتیوب منتقل شد (۱۱).

سنجش پتانسیل غشای میتوکندری

Mitochondrial Membrane Potential (MMP)

میتوکندری یکی از اندامک‌های اصلی در فرآیند آپوپتوز است. پتانسیل غشای میتوکندری به عنوان یک شاخص سلامت میتوکندری بررسی می شود. ماتریکس متالوپروتئیناز حاوی عنصر روی (Zn) هستند که باندهای پپتیدی پروتئین ها را تجزیه می‌کنند. و در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک که نیازمند تخریب ماتریکس خارج سلولی هستند، از جمله فرآیند ترمیم زخم، اندام زایی، متاستاز تومور و رگ زایی نقش دارند (۱۷). برای انجام این سنجش حدود ۱۵۰ میکرولیتر نمونه هموژنه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس از روی نمونه سانتریفیوژ شده ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و به باقی مانده آنها ۱۸۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات اضافه شد. محلول به دست آمده به خوبی مخلوط شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن را جدا کرده و برای رنگ آمیزی ۲۰ میکرولیتر رنگ رودامین ۱۲۳ در محیط تاریک، در میکروپلیت مخصوص به آن افزوده شد. سپس نمونه به دست آمده ۳۰ دقیقه انکوبه شد و در طول موج ٤٨٨ نانومتر تحریک و در ۵۲۰ نانومتر جذب نوری آن خوانده شد (۱۱).

سنجش فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز

Myeloperoxidase (MPO)

آنزیم میلوپراکسیداز (Myeloperoxidase) آنزیمی آهن دار در گرانولهای آزوروفیلیک نوتروفیلها است. که به میزان ۳۳/۰ از آنچه که در سلولهای پلی مورفونوکلئر (Cells Polymorphoneuclear) دیده می شود، در لیزوزومهای منوسیتی یافت می شود. این آنزیم اولین بار در سال ۱۹٤۱ شناسایی شد. ژن آن در ناحیه (۲۳-۱۷ q22) قرار دارد و به عنوان شاخص انفیلتراسیون نوتروفیلی شناخته می شود (۱۸). برای سنجش این آنزیم، سوپرناتانت هموژنه به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس نمونه ها در اتاق تاریک با آب اکسیژنه و تترا متیل بنزیدین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در مدت ۵ دقیقه مخلوط شدند. برای اتمام واکنش به محلول ها (H_2SO_4) اضافه شد و در اسپکتروفتومتر میزان جذب آن در طول موج ٤٥٠ نانومتر خوانده شد (۱۱).

تجزیه و تحلیل آماری

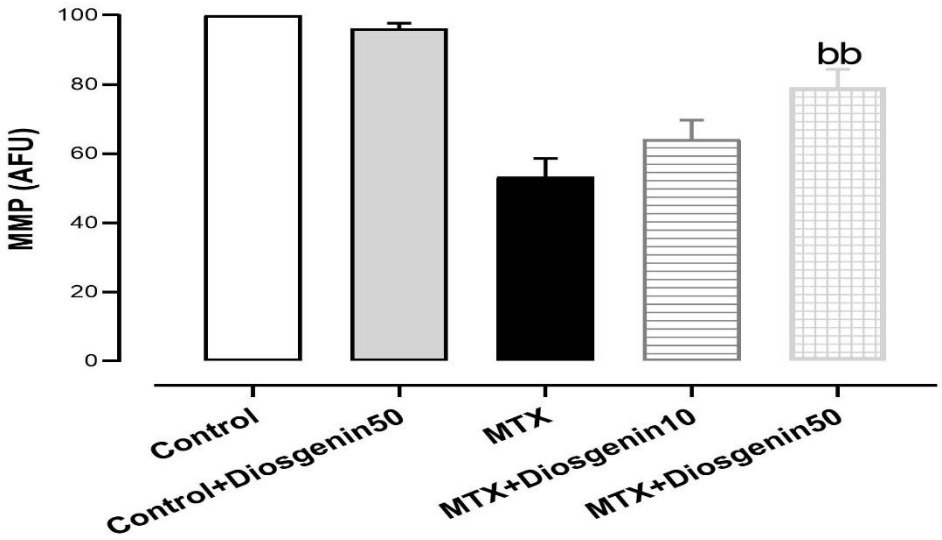
داده‌های به دست آمده از این پژوهش به کمک نرم افزار آماری Graph Pad Prism ۰/۸ تجزیه و تحلیل شدند. تمامی داده‌ها به صورت SEM±mean گزارش شدند. از آزمون Kolmogorov-Smirnov برای اطمینان از توزیع نرمال داده‌ها استفاده شد. سپس از آزمون ANOVA یکطرفه و به دنبال آن آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. در این مطالعه، P<0.05 بعنوان سطح معنا داری در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج سنجش پتانسیل غشای میتوکندری

Mitochondrial Membrane Potential (MMP)

با بررسی نتایج حاصل از سنجش میزان پتانسیل غشای میتوکندری به عنوان شاخص سلامت میتوکندری، در گروههای مختلف با توجه به (نمودار ۱) مشخص شد که، میزان پتانسیل غشای میتوکندری (MMP) در گروه دریافت کننده متوترکسات، نسبت به گروه کنترل کمتر شد (p=0.003). همچنین در گروه متوترکسات تیمارشده با دیوسجنین با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم میزان (MMP) نسبت به گروه کنترل کمتر شد (p=0.015). در گروه متوترکسات تیمار شده با دیوسجنین با دوز۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم، میزان (MMP) نسبت به گروه کنترل تغییر معنی داری را نشان نداد (p=0.091). از طرفی میزان (MMP) در گروه متوترکسات تیمار شده دیوسجنین با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه متوترکسات تغییر معنی داری را نشان نداد (p=0.19). میزان (MMP) در گروه متوترکسات تیمار شده با دیوسجنین با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه متوترکسات بیشتر شد (p=0.008) که نشان دهنده اثرات سودمند دیوسجنین با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم در این گروه می باشد. از طرفی میزان (MMP) در گروه کنترل دریافت کننده دیوسجنین با دوز۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی داری را نشان نداد (p=0.37).



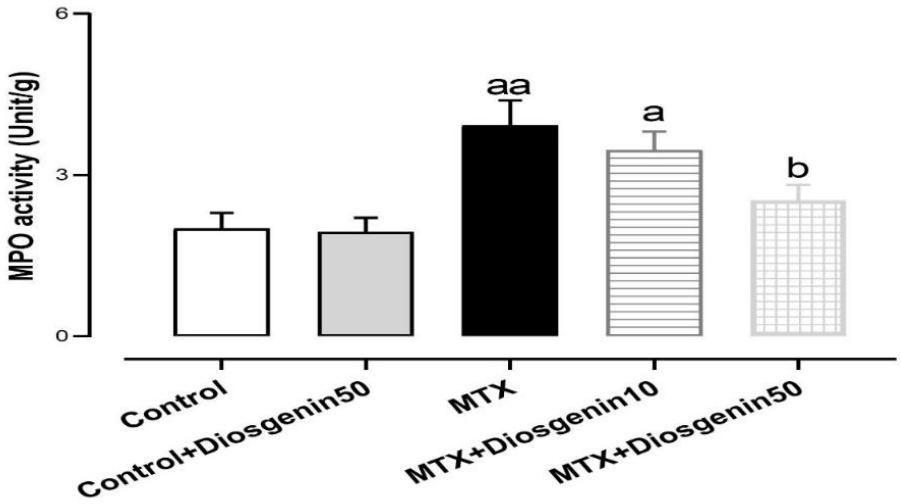
نمودار ۱. مقادیر حاصل از سنجش پتانسیل غشای میتوکندری (**MMP**) در بافت بیضه گروه های کنترل، کنترل مثبت با دیوسجنین دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم، گروه متوترکسات، گروه متوترکسات تیمارشده با دیوسجنین با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم و گروه متوترکسات تیمار شده با دیوسجنین با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم. **bb** : **P<0.01** در مقایسه با گروه متوترکسات بر اساس آزمون تعقیبی توکی

نتایج سنجش فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز

Myeloperoxidase (MPO)

با بررسی نتایج حاصل از فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز (MPO) به عنوان مارکر اختصاصی انفیلتراسیون نوتروفیلی در بافت بیضه در گروههای مختلف، با توجه به (نمودار ۲) مشخص شد که میزان (MPO) در گروه دریافت کننده متوترکسات نسبت به گروه کنترل بیشتر شد (p=0.009). همچنین میزان (MPO) در گروه متوترکسات تیمار شده با

دیوسجنین با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل نیز بیشتر شد (p=0.023). در گروه متوترکسات تیمار شده با دیوسجنین با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل تغییر معنی داری به دست نیامد (p=0.098). در گروه متوترکسات تیمار شده با دیوسجنین با دوز۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم میزان (MPO) نسبت به گروه متوترکسات تغییر معنی داری را نشان نداد (p=0.13). میزان(MPO) در گروه متوترکسات تیمار شده با دیوسجنین با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه متوترکسات تا حدی کمتر شد (p=0.039). همچنین میزان(MPO) در گروه کنترل دریافت کننده دیوسجنین با دوز ۵۰ میلی-گرم بر کیلوگرم تغییر معنی داری در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد (p=0.17).



نمودار ۲. مقادیر حاصل از سنجش فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز ((**MPO** بافت بیضه در گروه های کنترل، کنترل مثبت با دیوسجنین دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم، گروه متوترکسات، گروه متوترکسات تیمارشده با دیوسجنین با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم و گروه متوترکسات تیمار شده با دیوسجنین با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم.

aa : **P<0.01** در مقایسه با گروه کنترل **a** : **P<0.05** در مقایسه با گروه کنترل **b** : **P<0.05** در مقایسه با گروه متوترکسات بر اساس آزمون تعقیبی توکی

بحث

استرس اکسیداتیو یکی از علل آسیب به سلولهای زایای بافت بیضه و ناباروری در مردان می‌باشد. استرس اکسیداتیو سبب عدم تعادل بین تولید رادیکالهای آزاد و مواد آنتی اکسیدانی داخل سلول می‌شود (۱۹). رادیکالهای آزاد با آسیب به (DNA) و غشای اسپرم سبب از بین رفتن توانایی و حرکت اسپرم می‌شوند. رادیکالهای آزاد با حمله به لیپیدهای (PUFA) منجر به لیپید پراکسیداسیون و افزایش سطح (MDA) می‌شوند. همچنین با تخریب غشای داخلی و خارجی میتوکندری سبب کاهش سطح (GSH) و سبب آزاد شدن سیتوکروم (C) و فعال شدن کاسپاز و القاء آپوپتوز می‌شوند (۲۰،۲۱). عوامل بسیاری سبب ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شوند. داروی متوترکسات که در شیمی درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد، یکی از علل ایجاد استرس اکسیداتیو می‌باشد. متوترکسات مهار کننده رقابتی تولید اسید فولیک می‌باشد، که با اتصال به آنزیم دی هیدروفولات ردوکتاز (DHFR) از تبدیل دی‌هیدرو فولات (FH_2) به تترا هیدرو فولات (FH_4) جلوگیری می‌کند. فولات برای ساخته شدن (DNA) و (RNA) لازم و ضروری است (۲۲). متوترکسات با افزایش متابولیتهای اکسیژن و افزایش استرس اکسیداتیو باعث آسیب ساختار غشای سلول می‌شود. و باعث مهار تولید تترا هیدروفولات می‌شود، در نتیجه سبب اختلال فرآیندهای همانندسازی می‌شود (۲۳). در این مطالعه ما برای اولین بار اثرات دیوسجنین در آسیب بیضه القاء شده با متوترکسات را در موش بزرگ آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادیم. القاء متوترکسات به روش تزریق داخل صفاقی با دوز ۲۰

میلی‌گرم بر کیلوگرم انجام شد. در این مطالعه، در گروه دریافت کننده متوترکسات میزان فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز به عنوان شاخص انفیلتراسیون نوتروفیلی نسبت به گروه کنترل بیشتر شد. همچنین میزان پتانسیل غشای میتوکندری به عنوان شاخص سلامت میتوکندری نسبت به گروه کنترل کمتر شد. با توجه به مطالعه انجام شده توسط Yulug و همکاران در سال ۲۰۱۳ مشخص شد که متوترکسات تعادل بین پراکسیدازها و آنتی اکسیدانها را از بین می‌برد. و سبب افزایش میزان پرولیفراسیون و انفیلتراسیون نوتروفیلی و استرس‌اکسیداتیو می‌شود. فاکتورهای التهابی و آپوپتوز افزایش یافت، و سبب اسپرماتوژنز ناقص شد، که منجر به ناباروری می‌شود (٦). همچنین Omolaro و همکاران در سال ۲۰۱۹ در ارتباط با القاء استرس‌اکسیداتیو توسط (MTX) در بافت بیضه موشهای آلبینوسوئیسی نشان دادند که درمان (MTX باعث کاهش سطح هورمونهای تستوسترون، (FSH) و (LH) شده و استرس اکسیداتیو ناشی از (MTX) با کاهش معنی‌دار همزمان فعالیت آنزیم کاتالاز، گلوتاتیون احیاء و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و با افزایش همزمان رادیکالهای آزاد اکسیژن، پراکسیداسیون لیپیدی همراه بود (٢٤). در مطالعه خیاط نوری و همکاران در سال ۲۰۰۹ مشخص شد که متوترکسات سبب کاهش تقسیم سلولی و کاهش اسپرماتوژنز و تغییرات معنی‌دار در قطر لوله‌های منی‌ساز، ضخامت اپی تلیوم لوله های منی ساز، ضخامت بافت بینابینی و ضخامت کپسول همبند بافت بیضه موش صحرایی شد (۲۵). نتایج به دست آمده از این مطالعه با مطالعات انجام شده همسو بود. دیوسجنین[1] یک ساپوژنین استروئیدی است (۱۱) و به عنوان یک عامل آنتی اکسیدانی و ضد التهابی در مارکرهای اکسیداتیو همچون فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز و پراکسیداسیون چربی‌ها ثابت شده است. این استروئید پتانسیل زیادی در بیماریهای عصبی مثل آلزایمر[2] دارد. دیوسجنین توانائیهای حافظه و یادگیری را در تست موریس واترمیز بهبود بخشید و فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز را افزایش داد و سطح مالون دی‌آلدئید (MDA) را از طریق افزایش فعالیتهای آنزیماتیک آنتی‌اکسیدانتی آندوژنوز[3] کاهش داد (٢٦،٢٧). در این مطالعه دیوسجنین با دوزهای ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تجویز دهانی شد. در گروه متوترکسات تیمار شده با دیوسجنین دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، میزان فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز نسبت به گروه متوترکسات کاهش یافت. همچنین میزان پتانسیل غشای میتوکندری نسبت به گروه متوترکسات افزایش پیدا کرد. با توجه به مطالعه انجام شده توسط خسروی و همکاران در سال ۲۰۱۹ که اثر محافظتی دیوسجنین در برابر آسیب بیضه ناشی از دیابت در موش بزرگ آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که دیوسجنین علاوه بر جلوگیری از آسیب به توبول های سمینیفر در موش دیابتی باعث افزایش تعداد و میزان تحرک اسپرمها شد (۱۵). همچنین در مطالعه انجام شده توسط Jin و همکاران در سال ۲۰۲۰ اثر محافظت مجدد دیوسجنین بر آسیب کلیوی ناشی از اسید آریستولوچیک در موش بزرگ آزمایشگاهی با تأثیر بر آپوپتوز، پویایی میتوکندری و اتوفاژی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که دیوسجنین آسیب بافتی کلیوی ناشی از (AA–I) را تسکین داده و باعث مهار آپوپتوز شد و از طریق مهار(ULK1) از مسیر (MTOR) ، اتوفاژی برانگیخته شده با (AA-I) را مهار می‌کند (۲۸). در مطالعه Zhan و همکاران در سال ۲۰۱۹ مشخص شد که دیوسجنین بیان ژن رشد (NEED4) سلولهای سرطانی پروستات را مهار می‌کند و مانع از رشد سلولهای سرطانی می‌شود (۱۵). در مطالعه انجام شده توسط Tie Chen و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثرات محافظتی دیوسجنین در برابر سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین[4] در مدل In Vivo مورد بررسی قرار گرفت. و فاکتورهای (LDH)، (CPK) و کریتین کیناز میوکارد (CK-MB) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که دیوسجنین باعث کاهش سطح سرمی مارکرهای سمیت قلبی و گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و فعال سازی کاسپاز۳ و اختلال عملکرد میتوکندری و همچنین بیان فاکتور هسته‌ای کاپا شد. و با افزایش سطح قلبی (Cgmp) از طریق تعدیل فعالیت (PDE5) سبب بهبود فیبروز میوکارد در موش‌های تحت

1- Diosgenin
2- Alzheimer
3- Endogenous

درمان با (DOX) شد و دارای خاصیت آنتی اکسیدانی و محافظتی از طریق بیان (PKA) و (P38) می‌باشد (۲۹). نتایج به دست آمده از این مطالعه با نتایج مطالعات انجام شده همسو بود.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش متوترکسات باعث ایجاد تغییرات در میزان پتانسیل غشای میتوکندری و فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز می شود. دیوسجنین با خواص آنتی اکسیدانی خود می تواند عوارض ناشی از آسیب متوترکسات بر تغییرات میزان پتانسیل غشای میتوکندری و فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز در بافت بیضه را کاهش دهد و در درمان ناباروری مردان موثر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد خانم فاطمه طالع احمد می باشد که با حمایت مالی دانشگاه شاهد در سال ۱۳۹۹ انجام گرفته است.

ملاحظات اخلاقی

این پژوهش توسط کمیته اخلاق دانشگاه شاهد با شناسه (IR.SHAHED.REC.1898.120) به تصویب رسید.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد .

منابع

1. Mirzapour Al-e-hashem SMJ, Baboli A, Sazvar Z. A stochastic aggregate production planning model in a green supply chain: Considering flexible lead times, nonlinear purchase and shortage cost functions. European Journal of Operational Research 2013;230(1):26-41.
2. Sobhani M, Rouzbehi A, Mahmoodi R, Sobhani Z. The Protective Effect of Melatonin on Sperm Morphology and Histology of the Rat Testis Damage Induced by Cadmium Chloride. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2015;25(123):32-44.
3. Sayılmaz A, Karabulut YY, Özgörgülü A. The histopathological evaluation of healing effects of vitamin C administered before methotrexate therapy on testicular injury induced by methotrexate. Turkish Journal of Urology 2016;42(4):235.
4. Daggulli M, Dede O, Utangac MM, Bodakci MN, Hatipoglu NK, Penbegul N, et al. Protective effects of carvacrol against methotrexate-induced testicular toxicity in rats. International Journal of Clinical and Experimental Medicine 2014;7(12):5511.
5. Nouri HS, Azarmi Y, Movahedin M. Effect of growth hormone on testicular dysfunction induced by methotrexate in rats. Andrologia 2009;41(2):105-10.
6. Yuluğ E, Türedi S, Alver A, Türedi S, Kahraman C. Effects of resveratrol on methotrexate-induced testicular damage in rats. The Scientific World Journal 2013; https://doi.org/10.1155/2013/489659.
7. Ali N, Rashid S, Nafees S, Hasan SK, Shahid A, Majed F, et al. Protective effect of Chlorogenic acid against methotrexate induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat liver: An experimental approach. Chemico-Biological Interactions 2017;272:80-91.
8. Firouzabadi RD, Janati S, Razi MH. The effect of intrauterine human chorionic gonadotropin injection before embryo transfer on the implantation and pregnancy rate in infertile patients: A randomized clinical trial. International Journal of Reproductive BioMedicine 2016;14(10):657.
9. Gökçe A, Oktar S, Koc A, Yonden Z. Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced testicular injury. Human & Experimental Toxicology 2011;30(8):897-903.
10. El-Nour MM, Mohammed L, Saeed B. In vitro Callus induction of Fenugreek (Trigonellafoenum-graecumL.) Using Different Media with Different Auxins Concentrations. Agriculture and Biology

Journal of North America 2013;4(3):243-51.
11. Ghasemi Z, Kiasalari Z, Ebrahimi F, Ansari F, Sharayeli M, Roghani M. Neuroprotective effect of diosgenin in 6-hydroxydopamine-induced model of Parkinsonâ s disease in the rat. Daneshvar Medicine 2017;25(2):87-98.
12. Khosravi Z, Sedaghat R, Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Diosgenin ameliorates testicular damage in streptozotocin-diabetic rats through attenuation of apoptosis, oxidative stress, and inflammation. International Immunopharmacology 2019;70:37-46.
13. Oyelaja-Akinsipo OB, Dare EO, Katare DP. Protective role of diosgenin against hyperglycaemia-mediated cerebral ischemic brain injury in zebrafish model of type II diabetes mellitus. Heliyon 2020;6(1):e03296.
14. Wang H-W, Liu H-J, Cao H, Qiao Z-Y, Xu Y-W. Diosgenin protects rats from myocardial inflammatory injury induced by ischemia-reperfusion. Medical science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research 2018;24:246.
15. Zhang J, Xie J-J, Zhou S-J, Chen J, Hu Q, Pu J-X, et al. Diosgenin inhibits the expression of NEDD4 in prostate cancer cells. American Journal of Translational Research 2019;11(6):3461.
16. Li R, Liu Y, Shi J, Yu Y, Lu H, Yu L, et al. Diosgenin regulates cholesterol metabolism in hypercholesterolemic rats by inhibiting NPC1L1 and enhancing ABCG5 and ABCG8. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids 2019;1864(8):1124-33.
17. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical–biological functions and (Q) SARs. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2007;15(6):2223-68.
18. Unubol M, Yavasoglu I, Kacar F, Guney E, Omurlu I, Ture M. Relationship between glycemic control and histochemical myeloperoxidase activity in neutrophils in patients with type 2 diabetes. Diabetology & Metabolic Syndrome 2015 ; 7:119.
19. Zargari F. The role of oxidative stress and free radicals in diseases. Razi Journal of Medical Sciences 2020;27(2):10-22.
20. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. Human Reproduction Update 2008;14(3):243-58.
21. Fanaei H, Azizi Y, Khayat S. A review: role of oxidative stress in male infertility. Journal of Fasa University of Medical Sciences 2013;3(2):93-103.
22. Mazur DJ, Lipshultz LI. Infertility in the aging male. Current Urology Reports 2018;19(7):1-9.
23. Hirakawa K. Using folic acids to detect reactive oxygen species. Advances in Chemistry Research 2015;26:111-26.
24. Ojo OO, Ajayi OO, Ogunbiyi BT. Down-regulation of BMP8A, SMADs 1/5/8 and BAX Proteins Following Methotrexate-treatment in Testicular Tissue of Swiss Albino Mice. Annual Research & Review in Biology 2021:1-9.
25. KhayatNouri M, Safavi E, SeratiNouri H, Khaki A. Effects of methotrexate administration on testis histomorphometrical features of rats. Hormozgan Medical Journal 2010;13(4):219-26.
26. Jesus M, Martins AP, Gallardo E, Silvestre S. Diosgenin: recent highlights on pharmacology and analytical methodology. Journal of analytical methods in chemistry. 2016; https://doi.org/10.1155/2016/4156293.
27. Sanjeev S, Devi MS, Maurya K, Roy VK, Gurusubramanian G. Diosgenin: Therapeutic Action, Pharmacology and Applications. DOI:10.22232/stj.2017.05.01.01. Corpus ID: 55852236.
28. Jin C, Miao X, Zhong Y, Han J, Liu Q, Zhu J, et al. The renoprotective effect of diosgenin on aristolochic acid I-induced renal injury in rats: impact on apoptosis, mitochondrial dynamics and autophagy. Food & Function 2020;11(9):7456-67.
29. Chen C-T, Wang Z-H, Hsu C-C, Lin H-H, Chen J-H. In vivo protective effects of diosgenin against doxorubicin-induced cardiotoxicity. Nutrients 2015;7(6):4938-54.