

القا آسیب در بیضه توسط اتانول و ارزیابی اثر ملاتونین بر ترمیم و شاخص های دستگاه تولید مثلی

محمد حسام بیدختی نژاد^۱، حمیدرضا محمدی^{۲*}، سید جواد احمد پناهی^۳، سحر غفاری خلیق^۴، کیوان کرامتی^۳

^۱ دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
^۲ گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
^۳ گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
^۴ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

corresponding author: hr.mohammadi@semnan.ac.ir

خلاصه فارسی:

هدف از این مطالعه بررسی اثر آنتی اکسیدانی ملاتونین بر کاهش آسیب اکسیداتیو الکلی در بیضه رت های بالغ است. درواقع الکلی با پراکسیداسیون لیپید ها منجر به آسیب اکسیداتیو می شود و ملاتونین با روش های مختلفی می تواند رادیکال های آزاد را کاهش دهد. در این پژوهش، حیوانات تحت مطالعه به چهار گروه تقسیم شدند: گروه ۱ (کنترل منفی): دریافت روزانه نرمال سالیین خوراکی (۳ gr/kg) و تزریق داخل صفاقی نرمال سالیین به مدت ۲۸ روز. گروه ۲ (کنترل مثبت): القا آسیب اکسیداتیو بیضه با مصرف روزانه محلول ۳۰٪ اتانول خوراکی (۳ gr/kg) و تزریق داخل صفاقی نرمال سالیین به مدت ۲۸ روز. گروه ۳ (مداخله پیش گیری با دوز تحت بالینی ملاتونین): مصرف روزانه اتانول (۳ gr/kg) به همراه تزریق داخل صفاقی ملاتونین با دوز ۱۰ mg/kg ۵ برای پیش گیری از آسیب اکسیداتیو به مدت ۲۸ روز. گروه ۴ (مداخله پیش گیری با دوز بالینی ملاتونین): مصرف روزانه اتانول (۳ gr/kg) به همراه تزریق داخل صفاقی ملاتونین با دوز ۱۰ mg/kg به مدت ۲۸ روز.

برای حلالیت ملاتونین از اتانول ۱٪ استفاده شد. پس از پایان طرح از رت ها خونگیری شد و غلظت تستسترون با روش CLIA اندازه گیری شد. بعد از آسان کشی بیضه ها خارج و بعد از وزن کشی در محلول بافر فرمالین ۱۰٪ به مدت ۷۲ ساعت فیکس شد و متعاقب عمل آوری با شیوه های استاندارد بافت شناسی و قالب گیری توسط پارافین، مقاطعی به ضخامت ۵ میکرون تهیه شد و بعد از رنگ آمیزی H&E مورد مطالعه هیستومورفومتری قرار گرفت. اتانول باعث کاهش معنی دار وزن بیضه، غلظت تستوسترون سرم و پارامترهای هیستومورفومتریک در مقایسه با گروه کنترل منفی شد. درمان با ملاتونین با دوز تحت بالینی منجر به افزایش

معنی دار وزن بیضه، غلظت تستوسترون سرم و میانگین تعداد سلول های اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید در مقایسه با گروه کنترل مثبت شد ولی سایر پارامتر های هیستومورفومتریک تغییر معنی دار نداشت. درمان با ملاتونین با دوز بالینی منجر به افزایش معنی دار وزن بیضه، غلظت تستوسترون سرم و کلیه پارامتر های هیستومورفومتریک در مقایسه با گروه کنترل مثبت شد. به نظر می رسد که تجویز داخل صفاقی ملاتونین با دوز بالینی به مدت ۲۸ روز، عامل مهمی جهت بهبود آسیب اکسیداتیو در بافت بیضه می باشد و این عمل از طریق کاهش استرس اکسیداتیو صورت می گیرد.

کلید واژه ها: بیضه آسیب دیده، ملاتونین، دستگاه تولید مثل

Ethanol-induced testicular damage and evaluation of melatonin's effect on repair and reproductive system

Mohammad Hesam Beydokhti Nejad¹, Hamid Reza Mohammadi^{2*}, Javad Ahmad Panahi³, Sahar Qaffari Khaligh⁴, keyvan Keramati³

corresponding author: hr.mohammadi@semnan.ac.ir

1 Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

2 Department of Clinical sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Semnan, Semnan, Iran

3 Department of Basic sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Semnan, Semnan, Iran

4 Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Semnan, Semnan, Iran

Abstract:

The aim of this study is to evaluate the antioxidant effect of melatonin on reducing the oxidative damage of alcohol in the testes of adult rats. In fact, alcohol leads to oxidative damage by lipid peroxidation, and melatonin can reduce free radicals in different ways. In this study, the animals under investigation were divided into four group: **Group 1 (negative control):** Daily administration of normal saline orally (3 gr/kg) and intraperitoneal injection of normal saline for 28 days; **Group 2 (positive control):** Induction of testicular oxidative damage using a daily oral dose of 30% ethanol solution (3 gr/kg) and intraperitoneal injection of normal saline for 28 days; **Group 3 (intervention with subclinical dose of melatonin):** Daily oral administration of ethanol (3 gr/kg) along with intraperitoneal injection of melatonin at a dose of 5 mg/kg to prevent oxidative damage for 28 days; **Group 4 (intervention with clinical dose of melatonin):** Daily oral administration of ethanol (3 gr/kg) along with intraperitoneal injection of melatonin at a dose of 10 mg/kg for 28 days. 1% ethanol was used for melatonin solubility. At the end of the

study, blood samples were taken from rats and testosterone concentration was measured by CLIA method. The testes were removed and after weighing, they were fixed in 10% formalin buffer solution for 72 hours. After processing with standard histological methods and paraffin molding, sections with a thickness of 5 microns were prepared and after H&E staining, the histomorphometric study was performed. Ethanol significantly reduced testicular weight, serum testosterone concentration, and histomorphometric parameters compared to the negative control group. Combined treatment of melatonin with subclinical dose and ethanol resulted in a significant increase in testicular weight, serum testosterone concentration, and mean number of primary spermatocytes and spermatids compared to the positive control group, but other histomorphometric parameters did not change significantly. Combined treatment of melatonin with clinical dose and ethanol resulted in a significant increase in testicular weight, serum testosterone concentration, and all histomorphometric parameters in comparison with the positive control group. It seems that intraperitoneal administration of melatonin at a clinical dose for 28 days is an important factor in improving oxidative damage to testicular tissue by reducing oxidative stress.

Keywords: Testicular injuries, Melatonin, Reproductive System

مقدمه وهدف

2011) و نرخ باروری را در تخمک پیر به علت اثرات آنتی

اکسیدانی افزایش می دهد (Dai و همکاران، ۲۰۱۷).

سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل
یا گونه های واکنشگر اکسیژن (ROA) نام دارند که سبب
استرس اکسیداسیونی و آسیب به غشای سلول ها می شود.
افزایش تولید گونه های واکنشگر اکسیژن و یا کاهش آنزیم
های آنتی اکسیدانی، نقش مهمی در آسیب های
اکسیداسیونی در ارگان ها، بافت ها و سلول های مختلفی
مانند مغز، قلب و سلول های عروقی داشته و زمینه ساز
بسیاری از بیماری ها، مانند فشار خون و آترواسکلروز می

ملاتونین در دستگاه تولید مثلی نیز نقش بسیار مهمی دارد.
تولید این هورمون با طول نور روز رابطه ی عکس دارد لذا
عامل اصلی کنترل تولید مثل در حیوانات فصلی است. مثلاً
در گوسفند، بز، گاو و روباه با کاهش طول روز (پاییز و
زمستان) و در مادیان، گربه و خرس با افزایش طول روز (بهار
و تابستان) فعلی دیده می شود که ملاتونین به ترتیب به
صورت تحریکی و مهارى بر ترشح GnRH اثر می گذارد و
همچنین با افزایش گیرنده های پروژسترون تعداد جسم
زرد در تخمدان را افزایش می دهد (Romeu et al.,

مواد و روش کار

این مطالعه از نوع تجربی (مداخله ای) بوده و در دسته کارآزمایی آزمایشگاهی تصادفی قرار می‌گیرد. انجام این پژوهش با اخذ کد اخلاق IR.SU.REC.1399.10 از کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان صورت گرفت و در تمامی مراحل مطالعه رعایت گردید.

در این مطالعه از ۲۰ سر موش های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (۴ گروه ۵ تایی) در محدوده وزنی بین ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات مذکور از مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی آموزشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، واقع در شهرمیرزا خرداری شدند و در شرایط دمایی ۲۱ - ۲۵ درجه سانتی گراد و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. تغذیه رت‌ها توسط پلت تجاری مخصوص رت صورت گرفت و آب به صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار داده شد پس از وزن کشی، به طور تصادفی به ۴ گروه آزمایشی تقسیم شدند. جهت القاء آسیب اکسیداتیو از اتانول مطلق (۹۹٪/۸) شرکت سیمین تاک به شکل خوراکی استفاده شد. جهت جلوگیری از آسیب به مخاطات گوارشی، الکل را با آب مقطر به وسیله استوانه مدرج به رقت ۳۰٪ رسانده شد و روزانه با دوز ۳ gr/kg در گروه های هدف گاوژ گردید. جهت پیشگیری و بهبود آسیب اکسیداتیو از پودر ملاتونین (Sigma-Aldrich) استفاده شد و جهت حلالت بهتر با

باشد و نیز منجر به تنگی عروق و کاهش اکسیژن رسانی و مواد مغذی به بافت ها نیز می گردد. یافته ها نشان می دهند عوامل آنتی اکسیدانی مانند ویتامینهای A، E و C قدرت کمی در حفاظت در برابر رادیکال های آزاد دارند (Czesnikiewicz-Guzik Romeu et al., 2007).

ملاتونین می تواند از سد خونی - مغزی و نیز جفت به آسانی عبور کرده و بدون سختی به تمام اجزای داخل سلولی برسد. بنابراین، می تواند از آسیب دیواره های سلولی، ارگان ها و هسته در برابر رادیکال های آزاد محافظت نماید (Col et al., 2010). در پژوهش هایی که به منظور بررسی اثرات آنتی اکسیدانی ملاتونین انجام شد، مشاهده گردید دوزهای دارویی ملاتونین سبب افزایش سطح گلووتاتیون و گلووتاتیون S ترانسفراز و افزایش فعالیت گلووتاتیون پراکسیداز می شود (Rodriguez et al., 2004).

مطالعات نشان می دهد که تجویز اتانول با پراکسیداستو موجب اختلال در عملکرد RNA پیام بر و DNA گشته و باعث اختلال در تکثیر سلول های جنسی در موش های نر بالغ می شود (El-Sokkary et al., 2001). ملاتونین با تثبیت غشاهای میکروزومی، سبب مقاومت در برابر آسیب اکسیداسیونی می شود (Anisimov et al., 2004). در پژوهش حاضر برای نخستین بار اثر ملاتونین بر بهبود ضایعات ناشی از الکل در بیضه رت های بالغ از لحاظ هیستومورفومتریک مورد بررسی قرار گرفت.

۱٪ اتانول رقیق گردید و با دوز ۵ mg/kg و ۱۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی در گروه های تیمار تزریق شد. گروه کنترل منفی: روزانه به مدت ۲۸ روز ۳ gr/kg نرمال سالین به صورت خوراکی داده شد و تزریق داخل صفاقی نرمال سالین نیز به همین ترتیب انجام شد.

گروه کنترل مثبت: برای ایجاد آسیب اکسیداتیو در بیضه از محلول ۳۰٪ اتانول استفاده شد که به میزان ۳ gr/kg به صورت خوراکی، روزانه یکبار و به مدت ۲۸ روز داده شد و تزریق داخل صفاقی نرمال سالین نیز به همین ترتیب انجام شد.

تیمار ۱: به عنوان گروه مداخله ای پیش گیری با دوز تحت بالینی ملاتونین در نظر گرفته شد. برای ایجاد آسیب اکسیداتیو در بیضه از محلول ۳۰٪ اتانول استفاده شد که به میزان ۳gr/kg به صورت خوراکی داده شد و برای پیش گیری، از ملاتونین با دوز ۵ mg/kg به صورت تزریق داخل صفاقی روزانه یک بار و به مدت ۲۸ روز استفاده شد.

تیمار ۲: به عنوان گروه مداخله ای پیش گیری با دوز بالینی ملاتونین در نظر گرفته شد. برای ایجاد آسیب بیضه از محلول ۳۰٪ اتانول استفاده شد که به میزان ۳gr/kg به صورت خوراکی داده شد و برای پیش گیری، از ملاتونین با دوز ۱۰ mg/kg به صورت تزریق داخل صفاقی، روزانه یک بار و به مدت ۲۸ روز استفاده شد.

وزن کشی و گروه بندی تصادفی رت ها قبل مطالعه صورت گرفت. برای محاسبه ی دوز دارو ها، تمامی رت ها به صورت هفتگی وزن کشی می شدند و دوزاژ دارو ها برای هر رت به صورت جداگانه محاسبه شدند. هر روز ساعت ۱۲ ظهر اتانول از طریق گاواژ معدی داده می شد و ملاتونین به صورت داخل صفاقی به گروه های هدف تزریق می شد.

موش ها در طول ۲۸ روز، روزانه در ساعت مشخص تحت تیمار با ملاتونین قرار گرفتند. جهت آماده سازی محلول دارو، روزانه ۳۰ mg ملاتونین را با ترازوی دیجیتالی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین کرده و در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر با ۱٪ اتانول حل گردیدند و در نهایت با دوز ۵ mg/kg و ۱۰ که مبتنی بر مطالعات قبلی بود (El-Sokkary et al., 1999) به صورت داخل صفاقی تزریق شد.

پس از گذشت ۲۸ روز از شروع پژوهش رت ها با کتامین - زایلازین بیهوش گردیدند و خون گیری از قلب جهت سنجش تستوسترون انجام شد. از هر رت حدود ۵ سی سی خون اخذ شد و در لوله آزمایشگاهی نگهداری شد. سپس، بعد از آسان کشی همه ی حیوانات بیضه را خارج نموده و در سرم فیزیولوژی قرار داده شد و توسط ترازوی دیجیتالی وزن شدند. جهت ثبوت بافتی، بیضه ها بلافاصله بعد از تهیه، در محلول فرمالین ۱۰٪ در ظروف پلاستیکی جداگانه ای نگهداری شد. نمونه خون های اخذ شده به آزمایشگاه

پاتوبیولوژی رازی سمنان منتقل شد و با روش CLIA (Chemiluminescence Immunoassay) غلظت تستوسترون سرم سنجیده شد. نمونه های فیکس شده در فرمالین جهت مطالعه و تهیه مقاطع بافتی مورد استفاده قرار گرفتند.

بعد از مرحله تثبیت بافتی که با فرمالین انجام شد با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاری، برش هایی با ضخامت ۵ میکرون از نمونه ها تهیه شد. برای رنگ آمیزی برش های بافتی از روش متداول هماتوکسیلین ائوزین (H&E) استفاده شد. پس از طی مراحل رنگ آمیزی، اسلایدها توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. جهت شمارش سلول های اسپرmatوگونی، اسپرmatوسیت اولیه، اسپرmatید، سرتولی و لیدیک نیز از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی X ۱۰۰۰ استفاده شد و از هر لام ۱۰ لوله ی منی ساز گرد یا نسبتا گرد به طور تصادفی انتخاب شد و شمارش سلولی انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ انجام شد. گروه ها از نظر آماری از طریق تست آنالیز واریانس یک طرفه تحلیل شدند. یافته ها به صورت میانگین و انحراف معیار بیان و مقادیر $P \leq 0.05$ معنی دار تلقی گشت. جهت ارزیابی تفاوت معنی دار بین گروه ها از تست توکی استفاده شد.

نتایج

مشخص گردید که میانگین وزن بیضه ها در گروه کنترل مثبت نسبت به سایر گروه ها کاهشی معنی دار، دارد (جدول ۱) میانگین وزن بیضه ها در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی کمتر بود ولی تغییری معنی دار نداشت و در مقایسه با گروه کنترل منفی، کاهشی معنی دار و در مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایشی معنی دار داشت. میانگین وزن بیضه ها در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی در مقایسه با گروه کنترل مثبت، افزایشی معنی دار داشت و در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی و گروه کنترل منفی تغییری معنی دار نداشت اگرچه به ترتیب بیشتر و کمتر بود. میانگین غلظت تستوسترون سرم در گروه کنترل مثبت نسبت به سایر گروه ها کاهشی معنی دار، دارد. (جدول ۱).

میانگین غلظت تستوسترون سرم در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی کمتر بود ولی تغییری معنی دار نداشت و در مقایسه با گروه کنترل منفی، کاهشی معنی دار و در مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایشی معنی دار داشت. میانگین غلظت تستوسترون سرم در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی در مقایسه با گروه کنترل مثبت، افزایشی معنی دار داشت و در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی و گروه کنترل منفی

تغییری معنی دار نداشت اگرچه به ترتیب بیشتر و کمتر بود.
(جدول ۱)

میانگین قطر مجاری سمینیفروس در گروه کنترل مثبت، نسبت به گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی و گروه کنترل منفی کاهش معنی دار و در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی با وجود آن که مقدار کمتری دارد ولی تغییر آن معنی دار، نیست. میانگین قطر مجاری سمینیفروس در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی در مقایسه با گروه کنترل منفی، کاهش معنی دار داشت ولی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی و گروه کنترل مثبت، تغییر معنی داری نداشت اگر چه به ترتیب کمتر و بیشتر بود. میانگین قطر مجاری سمینیفروس در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی در مقایسه با گروه کنترل مثبت، افزایش معنی دار داشت ولی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی و گروه کنترل منفی، تغییر معنی داری نداشت اگرچه به ترتیب بیشتر و کمتر بود. میانگین قطر اپی تلیوم زایا در گروه کنترل منفی، در مقایسه با سایر گروه ها بزرگی معنی داری، دارد. میانگین قطر اپی تلیوم زایا در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی و کنترل منفی، کاهش معنی دار داشت ولی در مقایسه با گروه کنترل مثبت تغییر معنی داری نداشت، اگر چه مقداری بیشتر بود. میانگین قطر اپی تلیوم زایا در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی

در مقایسه با گروه کنترل منفی کاهش معنی دار داشت و در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی و گروه کنترل مثبت، افزایش معنی دار داشت
(جدول ۱).

میانگین تعداد سلول های اسپرماتوگونی در گروه کنترل منفی در مقایسه با سایر گروه ها، بزرگی معنی داری دارد. میانگین تعداد سلول های اسپرماتوگونی در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی در مقایسه با گروه کنترل منفی، کاهش معنی دار داشت ولی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی و گروه کنترل مثبت، تفاوت معنی داری نداشت، اگرچه به ترتیب کمتر و بیشتر بود. میانگین تعداد سلول های اسپرماتوگونی در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی، تفاوت معنی داری نداشت اگرچه بیشتر بود و در مقایسه با گروه کنترل منفی، کاهش معنی دار و در مقایسه با گروه کنترل مثبت، افزایش معنی دار داشت (جدول ۲).

میانگین تعداد سلول های سرتولی در گروه کنترل منفی در مقایسه با سایر گروه ها، بزرگی معنی داری دارد. میانگین تعداد سلول های سرتولی در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی در مقایسه با گروه کنترل منفی، کاهش معنی دار داشت ولی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی و گروه کنترل مثبت، تفاوت معنی

داری نداشت، اگرچه به ترتیب کمتر و بیشتر بود. میانگین تعداد سلول های سرتولی در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی، تفاوت معنی داری نداشت اگرچه بیشتر بود و در مقایسه با گروه کنترل منفی، کاهش معنی دار و در مقایسه با گروه کنترل مثبت، افزایش معنی دار داشت (جدول ۲).

میانگین تعداد سلول های اسپرماتوسیت اولیه در گروه کنترل مثبت نسبت به سایر گروه ها کاهش معنی دار، دارد. میانگین تعداد سلول های اسپرماتوسیت اولیه در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی و گروه کنترل منفی، کاهش معنی دار و در مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایش معنی دار داشت. میانگین تعداد سلول های اسپرماتوسیت اولیه در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی در مقایسه با گروه کنترل منفی کمتر بود ولی تفاوت معنی داری نداشت و در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی و گروه کنترل مثبت، افزایش معنی دار داشت. میانگین تعداد سلول های اسپرماتید در گروه کنترل مثبت نسبت به سایر گروه ها کاهش معنی دار،

دارد. میانگین تعداد سلول های اسپرماتید در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی و گروه کنترل منفی، کاهش معنی دار و در مقایسه با گروه کنترل مثبت، افزایش معنی دار داشت. میانگین تعداد سلول های اسپرماتید در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی در مقایسه با گروه کنترل منفی، کاهش معنی دار و در مقایسه با گروه کنترل مثبت، افزایش معنی دار، داشت. (جدول ۲).

میانگین تعداد سلول های لیدیک در گروه کنترل منفی در مقایسه با سایر گروه ها، بزرگی معنی دار، دارد. میانگین تعداد سلول های لیدیک در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی و گروه کنترل منفی، کاهش معنی دار و در مقایسه با گروه کنترل مثبت، اگرچه بیشتر بود ولی تفاوت معنی داری نداشت. میانگین تعداد سلول های لیدیک در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی در مقایسه با گروه کنترل منفی کاهش معنی دار و در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی و گروه کنترل مثبت، افزایش معنی دار، دارد. (جدول ۲).

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار وزن بیضه، غلظت تستوسترون، قطر لوله های منی ساز و ضخامت اپی تلیوم زایا. حروف نامشابه، بیانگر تفاوت معنی دار در سطح ۵ درصد است.

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار سلول های اسپرماتوگونی، سرتولی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و لیدینگ.

حروف نامشابه، بیانگر تفاوت معنی دار در سطح ۵ درصد است.

میانگین تعداد سلول های اسپرماتوگونی و انحراف معیار	میانگین تعداد سلول های اسپرماتید و انحراف معیار	میانگین تعداد سلول های اسپرماتوسیت اولیه و انحراف معیار	میانگین تعداد سلول های سرتولی و انحراف معیار	میانگین تعداد سلول های لیدینگ و انحراف معیار
کنترل منفی	$58/44 \pm 4/47$	$21/44 \pm 2/48$	$89/2 \pm 3/2$	$120 \pm 7/9$
کنترل مثبت	$39 \pm 3/16$	$12/62 \pm 1/55$	$47/8 \pm 1/98$	$60 \pm 7/9$
ملاتونین با دوز تحت بالینی	$45 \pm 2/23$	$15/06 \pm 1/53$	$64/2 \pm 2/2$	$75/4 \pm 3/64$
ملاتونین با دوز بالینی	$50/16 \pm 4/07$	$17/36 \pm 2/12$	$82/3 \pm 2/9$	$96/8 \pm 5/8$
بیضه و انحراف معیار	$11/83 \pm 1/1$	$11/83 \pm 1/1$	$11/83 \pm 1/1$	$11/83 \pm 1/1$
کنترل منفی	$2/58 \pm 0/18$	$2/32 \pm 0/21$	$394 \pm 23/02$	$110 \pm 9/81$
کنترل مثبت	$1/76 \pm 0/18$	$1/44 \pm 0/17$	$292/4 \pm 15/45$	$70/08 \pm 4/37$
ملاتونین با دوز تحت بالینی	$2/20 \pm 0/16$	$1/81 \pm 0/14$	$338/4 \pm 5/85$	$76/6 \pm 2/41$
ملاتونین با دوز بالینی	$2/36 \pm 0/10$	$2/08 \pm 0/08$	$348/6 \pm 45/44$	$93/32 \pm 4/22$

بحث و نتیجه گیری

پژوهش حاضر اثرات اتانول و ملاتونین را بر روی تغییرات وزن بیضه، غلظت تستوسترون سرم و پارامترهای هیستومورفومتريک بیضه شامل قطر مجاری منی ساز و ضخامت اپی تلیوم زایگر آن ها و تعداد سلول های لیدیگ، سرتولی، اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید بررسی نمود. این پارامترها می توانند اطلاعات مفیدی در ارتباط با پتانسیل باروری حیوانات ارائه دهند.

در این پژوهش تجویز ۳ gr/kg اتانول به مدت ۲۸ روز، منجر به کاهش معنی دار وزن بیضه ها شد. Aghaii و همکاران (۲۰۲۱) در مطالعه ایی نشان دادند ال-کارنیتین بر آسیب بیضه ناشی از مصرف اتانول در رت منجر به کاهش معنی دار وزن بیضه، غلظت تستوسترون سرم می شود. لذا پیشنهاد کردند پیشگیری با دوز خوراکی ال-کارنیتین تا حدودی از کاهش وزن بیضه، کاهش قطر لوله های منی ساز و ضخامت اپیتلیوم و کاهش تعداد سلولهای اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و لیدیگ جلوگیری می نماید.

Kumar در سال ۲۰۱۷ دریافت که در رت های نر بالغ نژاد albino تجویز اتانول با دوز ۳ gr/kg به روش گاوژ به مدت چهار هفته باعث کاهش چمشگیر وزن بیضه ها و غلظت تستوسترون سرم می شود.

در این پژوهش تجویز ۳ gr/kg اتانول به مدت ۲۸ روز، منجر به کاهش معنی دار غلظت تستوسترون سرم شد و به طور مشابه احمدی و شجاع زاده در سال ۱۳۹۴ دریافتند که در موش های سوری نر بالغ، تجویز اتانول با دوز ۳ gr/kg به روش گاوژ به مدت ۴۵ روز، منجر به کاهش معنی دار غلظت تستوسترون سرم می شود.

در این پژوهش تجویز ۳ gr/kg اتانول به مدت ۲۸ روز، منجر به کاهش معنی دار قطر مجاری منی ساز و ضخامت اپی تلیوم زایگر آن ها شد و به طور مشابه Kumar در سال ۲۰۱۷ دریافت که در رت های نر بالغ نژاد albino تجویز اتانول با دوز ۳ gr/kg به روش گاوژ به مدت چهار هفته باعث کاهش چمشگیر قطر مجاری سمینیفروس و ارتفاع اپیتلیوم آن ها و افزایش فضای خالی در بافت بینابینی می شود.

در مطالعه ای که Akang و همکاران در سال ۲۰۱۵ در رت های نر بالغ نژاد Sprague-Dawley با تجویز اتانول ۳۰٪ با دوز ۲ gr/kg به صورت خوراکی، روزانه به مدت ۴ هفته انجام دادند، مشخص شد که قطر اپیتلیوم لوله های سمینیفروس تغییر معناداری نداشت ولی قطر لوله های سمینیفروس کاهش چمشگیر داشت و فضای بینابینی عریض تر شد. عدم تغییر معنی دار ضخامت اپی تلیوم زایگر

در این مورد احتمالاً به علت دوزاژ کمتر اتانول و تفاوت نژادی در مقایسه با پژوهش حاضر می باشد.

در این پژوهش تجویز 3 gr/kg اتانول به مدت ۲۸ روز، منجر به کاهش معنی دار سلول های لیدیگ و سرتولی شد. Kumar در سال ۲۰۱۷ دریافت که در رت های نر بالغ نژاد albino تجویز اتانول با دوز 3 gr/kg به روش گاوآبه مدت چهار هفته باعث کاهش چشمگیر قطر هسته سلول های سرتولی و لیدیگ می شود.

در این پژوهش تجویز 3 gr/kg اتانول به مدت ۲۸ روز، منجر به کاهش معنی دار سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید شد. به طور مشابه Zhu و همکاران در سال ۲۰۰۰ نیز نشان دادند که تجویز اتانول سبب آپوپتوز اسپرماتوسیت ها و اسپرماتوگونی ها می گردد. در مطالعه ای که El-Sokkary در سال ۲۰۰۱ در رت های نر بالغ نژاد Sprague-Dawley با تجویز اتانول 40% با دوز 3 gr/kg به صورت تزریق زیرجلدی روزانه به مدت ۳۰ انجام داد، مشخص گردید که اتانول منجر به کاهش چشمگیری در میانگین تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید، سرتولی و لیدیگ می شود.

کاهش معنی دار سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید ممکن است ناشی از کاهش تستوسترون و آسیب سلول های سرتولی متعاقب آن باشد

چون سلول های سرتولی نقش حمایتی و تغذیه ای از سلول های جنسی را بر عهده دارند.

ملاتونین سیستم آنتی اکسیدانی داخلی را تحریک می کند و فعالیت گلوکوکورتیکوئیدها، گلوکوکورتیکوئیدها S ترانسفراز، سوپراکسید دیسموتاز و دیگر تیول ها را در خون، کبد و کلیه افزایش می دهد. هم چنین ملاتونین فعالیت گلوکوکورتیکوئیدها پروکسیداز و کاتالاز را در بیضه افزایش می دهد (Nishidia, ۲۰۰۵). در این پژوهش تجویز ملاتونین با دوز تحت بالینی و بالینی منجر به افزایش معنی دار وزن بیضه نسبت به گروه کنترل مثبت گشت و تفاوت معنی داری میان دوز بالینی و تحت بالینی وجود نداشت.

در این پژوهش تجویز ملاتونین با دوز تحت بالینی و بالینی منجر به افزایش معنی دار غلظت تستوسترون سرم نسبت به گروه کنترل مثبت گشت و تفاوت معنی داری میان دوز بالینی و تحت بالینی وجود نداشت. به طور مشابه Mohammad Ghasemi و همکاران در سال ۱۳۸۹ اثر ملاتونین با دوز 10 mg/kg به صورت داخل صفاقی و روزانه به مدت ۵ روز را جهت بهبود ضایعات ناشی از بوسولفان در بیضه رت های نر بالغ نژاد NMRI بررسی کردند. مشخص شد که در گروه درمان ترکیبی ملاتونین با بوسولفان، افزایش معنی دار غلظت تستوسترون در مقایسه با گروه بوسولفان وجود دارد. تأثیر مستقیم ملاتونین بر تولید تستوسترون در حیوانات مشخص شده است. در واقع سلول های لیدیگ

واجد گیرنده ملاتونین اند (Öner-Iyidogan et al., 2001).

در این پژوهش تجویز ملاتونین با دوز تحت بالینی منجر به تغییر معنی دار قطر لوله های منی ساز نسبت به گروه کنترل مثبت نشد ولی تجویز ملاتونین با دوز بالینی منجر به افزایش معنی دار گشت. به طور مشابه Nikbakht و Hejazi در سال ۲۰۱۵ اثر ملاتونین با دوز ۱۰ mg/kh را به صورت داخل صفاقی بر بهبود ضایعات ناشی از لاموتریجین در بیضه رت های نر بالغ بررسی کردند. مشخص شد که قطر لوله های منی ساز در گروه درمان ترکیبی ملاتونین با لاموتریجین، افزایش معنی دار در مقایسه با گروه کنترل مثبت دارد.

Soleimani Mehranjani و Azizi در سال ۲۰۲۰

در پژوهشی اثر ملاتونین با دوز ۲۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی، روزانه به مدت ۷ روز را بر بهبود ضایعات ناشی از دگزامتازون در بیضه رت های نر بالغ نژاد NMRI بررسی کردند. مشخص شد که در گروه درمان ترکیبی ملاتونین با دگزامتازون، میانگین قطر مجاری سمینیفروس نسبت به گروه کنترل مثبت، افزایش چشمگیر دارد.

در این پژوهش تجویز ملاتونین با دوز تحت بالینی منجر به تغییر معنی دار ضخامت اپی تلیوم زایا نسبت به گروه کنترل مثبت نشد ولی تجویز ملاتونین با دوز بالینی منجر به افزایش معنی دار گشت. به طور مشابه Sobhani و

همکاران در سال ۱۳۹۴ در پژوهشی اثر ملاتونین با دوز های ۱۵،۱۰ و ۲۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی، روزانه به مدت ۳۰ روز را بر بهبود ضایعات ناشی از کلرید کادمیوم در بیضه رت های نر بالغ نژاد ویستار بررسی کردند. مشخص شد که در گروه درمان ترکیبی ملاتونین به ویژه دوز ۲۰ mg/kg با کلرید کادمیوم، ضخامت اپی تلیوم زایا در مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایش چشمگیر دارد.

در مطالعه ای اثر ملاتونین با دوز ۱۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی و روزانه به مدت ۵ روز را بر بهبود ضایعات ناشی از آسپرین در بیضه ی رت های نر بالغ نژاد NMRI بررسی کردند. مشخص شد که در گروه درمان ترکیبی ملاتونین با آسپرین، میانگین ضخامت اپی تلیوم زایا در مقایسه با گروه کنترل مثبت واجد افزایش معنی دار است (Mohammad Ghasemi et al., 2010). در این

پژوهش تجویز ملاتونین با دوز تحت بالینی منجر به تغییر معنی دار میانگین تعداد سلول های سرتولی و لیدیگ نسبت به گروه کنترل مثبت نشد ولی تجویز ملاتونین با دوز بالینی منجر به افزایش معنی دار گشت. به طور مشابه فضیلی و همکاران در سال ۱۳۹۱ در پژوهشی اثر ملاتونین با دوز های ۱۰ و ۲۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی، روزانه به مدت ۱۴ روز را بر بهبود ضایعات ناشی از جمیستابین در بیضه رت های نر بالغ بررسی کردند. مشخص شد که در گروه های درمان ترکیبی ملاتونین با جمیستابین، میانگین تعداد سلول

های سرتولی و لیدیگ در مقایسه با گروه کنترل مثبت،
واجد افزایش معنی دار است.

Hejazi و Nikbakht در سال ۲۰۱۵ اثر ملاتونین با
دوز ۱۰ mg/kg را به صورت داخل صفاقی بر بهبود ضایعات
ناشی از لاموتریجین در بیضه رت های نر بالغ بررسی کردند.
مشخص شد که در گروه درمان ترکیبی ملاتونین با
لاموتریجین، میانگین تعداد سلول های سرتولی و لیدیگ در
مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایشی چشمگیر دارد. در واقع
با بهبود تعداد و عملکرد سلول های لیدیگ و سرتولی به
علت افزایش تولید تستوسترون توسط سلول های لیدیگ و
نقش حمایتی سلول های سرتولی، به طور طبیعی تعداد و
عملکرد سلول های جنسی نیز بهبود می یابد.

در این پژوهش تجویز ملاتونین با دوز تحت بالینی منجر
به تغییر معنی دار میانگین تعداد سلول های اسپرماتوگونی
نسبت به گروه کنترل مثبت نشد ولی تجویز ملاتونین با دوز
بالینی منجر به افزایشی معنی دار گشت. به طور مشابه
Chabra و همکاران در سال ۲۰۱۴ در پژوهشی اثر
ملاتونین با دوز های ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ به صورت
داخل صفاقی، روزانه به مدت ۵ روز را بر بهبود ضایعات ناشی
از سیکلوفسفامید در بیضه موش های نر بررسی کردند.
مشخص شد که در گروه های درمان ترکیبی ملاتونین با
سیکلوفسفامید، میانگین تعداد سلول های اسپرماتوگونی در
مقایسه با گروه کنترل مثبت، افزایشی چشمگیر دارد.

در مطالعه حاضر مشخص شد که دوز بالینی
ملاتونین باعث کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از اتانول در
بافت بیضه می شود. احتمالاً این تغییرات می تواند ناشی از
دو مکانیسم باشد: ۱- خاصیت آنتی اکسیدانی قوی
ملاتونین، چرا که ملاتونین می تواند فعالیت و یا بروز ژن
های آنزیم های آنتی اکسیدان مانند: سوپر اکسید دیس
موتاز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پر اکسیداز را تحریک
نماید (Reiter et al., 2001). ۲- آنتی آپوپتوتیک
ملاتونین، که با مهار روند آپوپتوز سلول های زلیا مانع
تخریب اسپرماتوژنز می شود (Ateşşahin et al., 2006).
نتایج این مطالعه نشان داد که اتانول منجر به کاهش
وزن بیضه، غلظت تستوسترون سرم و پارامتر های
هیستومورفومتريک بیضه می شود و درمان با دوز بالینی
ملاتونین منجر به افزایش وزن بیضه، غلظت تستوسترون
سرم و پارامتر های هیستومورفومتريک می گردد.

References:

- Ahmadi^[h1] A, & Shojazadeh S. (2015). Evaluation of the effect of Experimental of alcoholism on testis tissue and sperm quality in adult mouse model. *Studies in Medical Sciences*, 26 (2),112-120 (In persian)
- Sobhani M, Rouzbehi A, Mahmoodi R, Sobhani Z. (2015). The Protective Effect of Melatonin on Sperm Morphology and Histology of the Rat Testis Damage Induced by Cadmium Chloride. *J Mazandaran Univ Med Sci*, 25 (123), 32-44 (In persian)
- Mohammad Ghasemi F., Faghani M., Fallah Korkan M. (2010). The Protective Effect of Melatonin on Sperm Parameters, Epididymis and Seminal Vesicle Morphology in Adult Mouse Treated with Busulfa. *Journal of Iranian Anatomical Sciences*, 8 (25-36) (In persian)
- Mohammad Ghasemi F, Khaje Jahromi S, Hedayati Omami N. (2012). Protective Effect of Melatonin on the Quality of Spermatogenesis and Sperm Parameters in the Mice Treated with Acetylsalicylic Acid. *Avicenna J Clin Med*.18 (4), 29-36 (In persian)
- Fazili A., Pusti E. (2012). Study of protective effect of melatonin on histological changes in spermatogenesis rat treated by jemicitabine, 9(2), 683-692 (In persian)^[h2]
- Aghaii, M., Ahmadpanahi, J., Mohammadi, H., Yousefi, M., Naeimi, S. (2021). Histomorphometric evaluation of the effect of L-Carnitine on testicular injuries caused by ethanol in rats. *Journal of veterinary Laboratory Research*, 13(2), 137-149. DOI: [10.22075/JVLR.2023.30486.1067](https://doi.org/10.22075/JVLR.2023.30486.1067)
- Ateşşahin, A., Şahna, E., Türk, G., Çeribaşı, A. O., Yılmaz, S., Yüce, A., & Bulmuş, Ö. (2006). Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *Journal of pineal research*, 41(1), 21-27. DOI: [10.1111/j.1600-079X.2006.00327.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00327.x) PMID: 16842537
- Akang, E. N., Oremosu, A. A., Osinubi, A. A., Dosumu, O. O., Kusemiju, T. O., Adelakun, S. A., Umaru, M. L. (2015). Histomorphometric studies of the effects of Telfairia occidentalis on alcohol-induced gonadotoxicity in male rats. *Toxicology reports*, 2, 968-975. DOI: [10.1016/j.toxrep.2015.06.009](https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.06.009) PMID: 28962436
- Anisimov, V. N. (2003). Effects of exogenous melatonin-a review. *Toxicologic pathology*, 31(6), 589-603. DOI: [10.1080/01926230390257885](https://doi.org/10.1080/01926230390257885) PMID: 14585727
- Chabra, A., Shokrzadeh, M., Naghshvar, F., Salehi, F., Ahmadi, A. (2014). Melatonin ameliorates oxidative stress and reproductive toxicity induced by cyclophosphamide in male mice. *Human & experimental toxicology*, 33(2), 185-195. DOI: [10.1177/0960327113489052](https://doi.org/10.1177/0960327113489052) PMID: 23703819
- Col, C., Dinler, K., Hasdemir, O., Buyukasik, O., & Bugdayci, G. (2010). Oxidative stress and lipid peroxidation products: effect of pinealectomy or exogenous melatonin injections on

biomarkers of tissue damage during acute pancreatitis. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international: HBPD INT*, **9(1)**, 78-82. PMID: [20133234](#)

Czesnikiewicz-Guzik, M., Konturek, S. J., Loster, B., Wisniewska, G., & Majewski, S. (2007). Melatonin and its role in oxidative stress related diseases of oral cavity. *J PhysiolPharmacol*, **58 (3)**, 5-19. PMID: 17901579

Dai, X., Lu, Y., Zhang, M., Miao, Y., Zhou, C., Cui, Z., Xiong, B. (2017). Melatonin improves the fertilization ability of post-ovulatory aged mouse oocytes by stabilizing ovastacin and Juno to promote sperm binding and fusion. *Human reproduction*, **32(3)**, 598-606. DOI: [10.1093/humrep/dew362](#) PMID: 28137755

El-Sokkary, G. H. (2001). Quantitative study on the effects of chronic ethanol administration on the testis of adult male rat. *Neuroendocrinology Letters*, **22(2)**, 93-100. PMID: 11335885

El-Sokkary, G. H., Reiter, R. J., Tan, D. X., Kim, S. J., Cabrera, J. (1999). Inhibitory effect of melatonin on products of lipid peroxidation resulting from chronic ethanol administration. *Alcohol and Alcoholism*, **34(6)**, 842-850. DOI: [10.1093/alcalc/34.6.842](#)

Kumar, B. S. (2017). Fertility effect of cycas circinalis and ionidium suffruticosum in alcohol induced sterility of male wistar rats-An histomorphometric study. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **8(2)**, 825. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.8(2).825-30

Nishida, S. (2005). Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and diabetes mellitus. *Endocrine*, **27(2)**, 131-135. DOI: [10.1385/endo:27:2:131](#) PMID: 16217126

Nikbakht, S., & Hejazi, S. (2015). Protective role of melatonin in histomorphometric changes of fetal mice testis by lamotrigine induced. *Cibtech Journal of Zoology*, **4(1)**, 37-44. PMID: 28580446 DOI: 10.4067/S0717-95022013000300012

Öner-Iyidogan, Y., Gürdöl, F., Öner, P. (2001). The effects of acute melatonin and ethanol treatment on antioxidant enzyme activities in rat testes. *Pharmacological Research*, **44(2)**, 89-93. DOI: [10.1006/phrs.2001.0828](#) PMID: 11516256

Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Qi, W. (2001). Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *Cell biochemistry and biophysics*, **34(2)**, 237-256. DOI: [10.1385/CBB:34:2:237](#) PMID: 11898866

Rodriguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V., Reiter, R. J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of pineal research*, **36(1)**, 1-9. DOI: [10.1046/j.1600-079x.2003.00092.x](#) PMID: 14675124

Romeu, L. R. G., da Motta, E. L. A., Maganhin, C. C., Oshima, C. T., Fonseca, M. C., Barrueco, K. F., Soares-Junior, J. M. (2011). Effects of melatonin on histomorphology and on the expression of steroid

receptors, VEGF and PCNA in ovaries of pinealectomized female rats. *Fertility and sterility*, 95(4), 1379-1384. DOI: [10.1016/j.fertnstert.2010.04.042](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.04.042) PMID: 20605140

Soleimani Mehranjani, M., Azizi, M., & Sadeghzadeh, F. (2020). The effect of melatonin on testis histological changes and spermatogenesis indexes in mice following treatment with dexamethasone. *Drug and Chemical Toxicology*, 1-10. DOI: [org/10.1080/01480545.2020.1809672](https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1809672)

Zhu, Q., Meisinger, J., Emanuele, N. V., Emanuele, M. A., LaPaglia, N., & Van Thiel, D. H. (2000). Ethanol exposure enhances apoptosis within the testes. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 24(10), 1550-1556. DOI: [10.1111/j.1530-0277.2000.tb04574.x](https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2000.tb04574.x) PMID: 11045864

UNCORRECTED PROOF