



بررسی اثر تیموکینون بر کیفیت سمن موش صحرایی مواجهه شده با دیازینون

لیلا تاجیک (MSc)^{۱*}، سیما نصری (PhD)^{۱**}، احسان رئیس‌عبداللهی (PhD)^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

^۲ گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۹۸/۵/۲۲ - پذیرش مقاله: ۹۸/۱۰/۱۰)

چکیده

زمینه: سموم ارگانوفسفره از جمله دیازینون، سبب تولید رادیکال‌های آزاد، کاهش توان آنتی اکسیدانی سلولی و نابرابری در جنس نر می‌شوند. تیموکینون یک ترکیب فعال موجود در سیاه دانه است که اثرات آنتی اکسیدانی آن به اثبات رسیده است. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر تیموکینون بر استرس القاء شده توسط دیازینون و کیفیت سمن موش صحرایی نر است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۲۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم به صورت تصادفی در ۴ گروه هفت‌تایی قرار گرفتند. در گروه اول، تک دوز روغن زیتون خالص، در گروه دوم، تک دوز دیازینون (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و در گروه سوم، تیموکینون با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی به مدت ۵ روز تجویز شد. در گروه چهارم، ابتدا تیموکینون با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تجویز و ۳ روز بعد دیازینون با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تزریق شد. ۳۶ ساعت بعد از تزریق داروها، بررسی کیفیت سمن شامل ارزیابی تعداد، تحرک، مورفولوژی و زنده مانی اسپرم‌ها مورد بررسی قرار گرفت و میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در بافت بیضه نیز سنجیده شد. یافته‌ها: در این مطالعه کاهش معنی‌دار حرکت اسپرم و افزایش معنی‌دار میزان MDA در بافت بیضه، متعاقب تجویز دیازینون نسبت به گروه کنترل ($p < 0.001$) مشاهده گردید. همچنین تیموکینون موجب افزایش حرکت اسپرم و کاهش میزان MDA در بافت بیضه ($p < 0.001$) در حضور دیازینون نسبت به گروه دیازینون شد.

نتیجه‌گیری: از آنجا که دیازینون با تولید رادیکال‌های آزاد سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در بافت بیضه می‌شود، می‌توان چنین نتیجه گرفت که تجویز تیموکینون به عنوان آنتی اکسیدان، باعث کاهش سمیت دیازینون در بافت بیضه موش صحرایی و افزایش کیفیت سمن گردید.

واژگان کلیدی: کیفیت سمن، تیموکینون، دیازینون، پراکسیداسیون لیپیدی، موش صحرایی نر

^{**} تهران، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

Email: s_nasri1@pnu.ac.ir

*ORCID: 0000-0001-6409-1907

**ORCID: 0000-0001-7849-6315

مقدمه

دیازینون^۱ با نام شیمیایی O,O-دی اتیل O-[۴-متیل-۶-پیریمیدین-۲-یل] فسفوروئیوات^۲ (پروپان-۲-یل) پیریمیدین-۲-یل] فسفوروئیوات^۲ یکی از آفت کش های ارگانوفسفره است که به صورت گسترده برای کنترل حشرات و آفات محصولات گیاهی در مزارع کشاورزی و باغات مورد استفاده قرار می گیرد (۱). مطالعات قبلی آثار زیانبار دیازینون بر بخش های مختلف بدن از جمله کبد، عضلات، ماهیچه، کلیه، پانکراس، طحال، مغز و سیستم تولید مثل را تأیید کرده است (۲). دیازینون از عوامل القاء کننده تولید رادیکال های آزاد و ایجاد استرس اکسیداتیو در بدن محسوب می شود (۳). افزایش تولید رادیکال های آزاد باعث تغییر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و در نهایت، مرگ سلولی حاصل از استرس اکسیداتیو می شود (۴).

مطالعات قبلی نشان داده اند که مواجهه با سموم ارگانوفسفره، با کاهش میزان کیفیت اسپرم همراه بوده و سلول های جنسی نر می توانند تحت تأثیر اینگونه سموم قرار بگیرند (۵). ارگانوفسفره هایی مثل دیازینون، ممکن است با ورود به داخل مایع سمن و کاهش فعالیت و حیات اسپرم، تغییرات جبران ناپذیری را بر پارامترهای اسپرم شامل حرکت، تعداد و مورفولوژی آن بگذارند (۶).

تیموکینون یکی از مواد مؤثره گیاه سیاه دانه (*Nigella sativa*) و یک مونوترپن با نام استاندارد شیمیایی ۲-ایزوپروپیل ۵-متیل-۱،۴-بنزوکینون است که بسیاری از خواص روغن سیاه دانه به آن نسبت داده شده است (۷). مهم ترین خواص فارماکولوژیکی

تیموکینون عبارتند از: خاصیت ضد تشنجی، ضد میکروبی، ضد سرطان، آنتی هیستامینی، ضد دیابت، ضد التهاب و آنتی اکسیدانی است. تیموکینون قادر است با افزایش توان آنتی اکسیدانی به پاکسازی رادیکال های آزاد و آنیون های سوپراکسید کمک کرده و رونویسی ژن های مسئول تولید آنتی اکسیدان های درون زاد بدن از جمله سوپراکسید دیسموتاز (SOD)^۳، کاتالاز (CAT)^۴ و گلوتاتیون پراکسیداز (GSH)^۵ را افزایش دهد (۸).

با توجه به اینکه استفاده از آنتی اکسیدان ها جهت کاهش سمیت ترکیبات ارگانوفسفره مفید بوده است (۹)، در این مطالعه اثرات تیموکینون بر کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیازینون در اسپرماتوزن و کیفیت سمن موش صحرایی نر مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

در این مطالعه جهت سهولت در توزین، ابتدا محلول دیازینون (Merck, Germany) در روغن زیتون خالص (Sigma, USA)، به میزان ۵۰ میلی لیتر ساخته شد. برای این کار با توجه به چگالی دیازینون خالص مورد استفاده که ۱/۱۱۷ کیلوگرم بر لیتر بود، ۲۲۵ میکرولیتر دیازینون در ۵۰ میلی لیتر روغن زیتون خالص حل شد که در این حالت هر میلی لیتر از این امولسیون معادل دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم برای حیوانات با وزن ۲۵۰ گرم محسوب می گردد و برای هر حیوان با توجه به وزن حیوان از این امولسیون به صورت تزریق داخل صفاقی استفاده گردید. جهت تهیه محلول تیموکینون نیز، ابتدا ۲۵۰ میلی گرم تیموکینون (Sigma, USA) در

¹ Diazinon² O,O-Diethyl O-[4-methyl-6-(propan-2-yl)pyrimidin-2-yl] phosphorothioate³ Superoxide dismutase⁴ Catalase⁵ Glutathione peroxidase

مقدار کمی DMSO⁶ ۰/۵ درصد حل شده و سپس حجم محلول با روغن زیتون خالص (Sigma, USA) به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد که در این حالت هر میلی‌لیتر از این امولسیون، حاوی ۲/۵ میلی‌گرم تیموکینون بوده و معادل دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم برای حیوانات با وزن ۲۵۰ گرم محسوب می‌گردد. سپس با توجه به وزن حیوان دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به روش داخل صفاقی تزریق شد.

حیوانات

در مطالعه حاضر از تعداد ۲۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در تمامی مراحل مطالعه در شرایط استاندارد دما، تغذیه و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شده و در تمام مراحل پژوهش بر اساس قوانین کار با حیوانات آزمایشگاهی کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی دانشگاه پیام نور با آن‌ها رفتار گردید و به صورت تصادفی در ۴ گروه هفت تایی قرار گرفتند. گروه کنترل تک دوز روغن زیتون خالص (Sigma, USA) را به میزان ۱ میلی‌لیتر به عنوان حلال داروها دریافت نمودند (۱۰). در گروه تیموکینون (TQ)، حیوانات ۱ میلی‌لیتر محلول تیموکینون (Sigma, USA) در روغن زیتون خالص (Sigma, USA) را با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۵ روز متوالی دریافت نمودند (۱۱). در گروه دیازینون (DZN)، حیوانات ۱ میلی‌لیتر محلول دیازینون (Merck, Germany) در روغن زیتون خالص (Sigma, USA) را به صورت تک دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت نمودند (۱۲). در گروه تیموکینون-دیازینون (TQ-DZN)، حیوانات به مدت ۵ روز متوالی

۱ میلی‌لیتر تیموکینون را با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و در روز سوم نیز ۱ میلی‌لیتر تک دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دیازینون را توأمآ دریافت نمودند (۱۱). بیهوش کننده و تمام داروها به صورت داخل صفاقی (i.p) تجویز شدند. لازم به ذکر است این پژوهش با شماره کد اخلاق ۰۸۶.۱۳۹۹. IR.PNU.REC در کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی دانشگاه پیام نور مورد تایید قرار گرفت.

نمونه‌گیری از حیوانات

۳۶ ساعت بعد از تزریق داروها (۱۲)، با بیهوش نمودن حیوانات به وسیله تزریق داخل صفاقی کتامین ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، نمونه اسپرم از دم اپیدیدیم بیضه چپ تهیه و اسپرم‌ها از نظر تعداد، حرکت، مورفولوژی و زنده بودن مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین در تمامی حیوانات، بیضه راست خارج گردید و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی به نیتروژن مایع منتقل و سپس در دمای -۷۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شد (۱۲).

بررسی تعداد اسپرم‌ها

برای شمارش اسپرم‌ها، یک سانتی‌متر از بخش دم اپیدیدیم چپ حیوان جدا شده و پس از خروج از بدن در نرمال سالین شسته شد. بافت اپیدیدیم در یک پتری دیش حاوی ۵ میلی‌لیتر نرمال سالین با دمای ۳۷ درجه سلسیوس خرد شده و پس از به هم زدن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل مجدداً با ۴ میلی‌لیتر نرمال سالین رقیق شد که بر این اساس رقت نهایی نمونه

⁶ Dimethyl sulphoxide

⁷ Intraperitoneal injection

معادل ۱:۲۰ گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق شده بر روی لام نئوبار قرار داده و با لامل پوشانده شد. بعد از ۵ دقیقه زیر میکروسکوپ نوری و با عدسی ۴۰، اسپرم‌ها در ۵ مربع (۴ مربع کنار و یک مربع وسط) شمارش گردیدند. عدد به دست آمده برای هر نمونه در عدد یک میلیون ضرب شد تا تعداد کل اسپرم‌ها در هر میلی‌لیتر نمونه به دست آید (۱۳). برای هر حیوان ۳ نمونه لام به روش فوق تهیه و شمارش اسپرم‌ها بر اساس روش مذکور انجام و میانگین سه نمونه به عنوان داده نهایی در نظر گرفته شد.

بررسی درصد اسپرم‌های متحرک

ارزیابی حرکت اسپرم مطابق الگوی WHO^۸ انجام شد (۱۴). برای این کار بلافاصله بعد از جدا کردن بخش دم اپیدیدیم چپ حیوان، ۱۰ میکرولیتر از محلول حاوی اسپرم در نرمال سالین ۳۷ درجه سلسیوس را با استفاده از سمپلر برداشته و روی لام که از قبل به دمای ۳۷ درجه رسیده بود قرار داده و با یک لامل هم دما پوشانده و زیر میکروسکوپ نوری با عدسی ۴۰ و در حداقل ۱۰ میدان دید میکروسکوپ تا ۲۰۰ اسپرم شمارش و از نظر میزان حرکت مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم‌ها بر اساس سرعت حرکت در چهار گروه طبقه‌بندی گردیدند: اسپرم‌های دارای حرکت پیشرونده به عنوان گروه A، اسپرم‌های دارای حرکت پیشرونده با سرعت کمتر از گروه A به عنوان گروه B، اسپرم‌های دارای حرکت غیرپیشرونده شامل حرکت در جا یا مارپیچی و چرخشی به عنوان گروه C و نهایتاً اسپرم‌های فاقد حرکت در گروه D (۱۵). در این مطالعه گروه‌های A، B، C به عنوان کل اسپرم‌های دارای حرکت در نظر گرفته شده و اسپرم‌های گروه D به عنوان اسپرم‌های فاقد

حرکت در گروه‌های مورد مطالعه مقایسه شدند. در هر گروه آزمایشی تعداد اسپرم‌ها در هر کدام از دو رده فوق شمارش و نتیجه به صورت درصد ثبت شد. برای هر حیوان ۳ نمونه لام به روش فوق تهیه و حرکت اسپرم‌ها برابر روش مذکور سنجش و میانگین سه نمونه به عنوان داده نهایی در نظر گرفته شد.

روش ارزیابی زنده‌مانی اسپرم

برای تعیین درصد اسپرم‌های زنده و مرده از روش رنگ آمیزی اتوزین-نیگروزین^۹ استفاده شد. یک قطره از نمونه اسپرم در هر گروه را با یک قطره رنگ روی لام قرار داده و با یک لامل پوشانده و پس از ۳۰ ثانیه تعداد اسپرم‌های زنده و مرده با عدسی ۴۰ میکروسکوپ نوری شمارش شد. اسپرم‌های زنده رنگ نشده ولی اسپرم‌های مرده که غشای پلاسمایی آن‌ها آسیب دیده بود رنگ قرمز به خود گرفتند. در هر حیوان حداقل ۲۰۰ اسپرم از نظر زنده‌مانی مورد بررسی قرار گرفت (۱۶). برای هر حیوان ۳ نمونه لام به روش فوق تهیه و ارزیابی زنده‌مانی اسپرم‌ها برابر روش فوق انجام و میانگین سه نمونه به عنوان داده نهایی لحاظ گردید.

ارزیابی شکل اسپرم

ابتدا از نمونه اسپرم در هر گروه یک قطره با یک قطره رنگ اتوزین-نیگروزین مخلوط شد و پس از ۳۰ ثانیه یک اسمیر روی لام تهیه و اسمیر رنگ‌آمیزی شده در دمای اتاق خشک شد، سپس با عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری، تعداد اسپرم‌هایی که دارای هر نوع بدشکلی بودند شمارش گردید. در هر نمونه حداقل ۵ میدان و در هر میدان ۴۰ اسپرم (مجموعاً ۲۰۰ اسپرم در هر لام) مورد ارزیابی قرار

^۸ World Health Organization

^۹ Eosin-Nigrosin staining

گرفت (۱۶). برای هر حیوان ۳ نمونه لام به روش فوق تهیه و ارزیابی شکل اسپرم‌ها برابر روش فوق انجام و میانگین سه نمونه به عنوان داده نهایی ثبت شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز داده‌های حاصل از این تحقیق شامل یافته‌های کیفی مثل حرکت و زنده ماندن بر اساس میانگین درصد $\pm$ خطای معیار و در مورد یافته‌های کمی بر حسب میانگین $\pm$ خطای معیار گزارش و برای مقایسه بین گروه‌ها با توجه به نرمال بودن داده‌ها، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست متعاقب توکی استفاده شد. مقدار p -value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

برابر جدول ۱، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تجویز تک دوز دیازینون با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و تجویز ۵ روزه تیموکینون به صورت تزریق داخل صفاقی با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و تجویز توام این دو ماده، تغییر معنی‌داری بر تعداد اسپرم‌ها، درصد اسپرم‌های دارای انواع بدشکلی و درصد اسپرم‌های زنده نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد ($p > 0/05$).

روش نمونه‌گیری و سنجش MDA¹⁰ در بافت بیضه
در این مطالعه میزان MDA در بافت بیضه با استفاده از روش Esterbauer و Cheeseman مشخص شد که بر اساس واکنش MDA با تیوباربتوریک اسید است (۱۷). ۵۰ میلی‌گرم از بافت بیضه با ۱ میلی‌لیتر از محلول تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۱۰ درصد هموژن شد. سپس با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و بعد از آن ۵۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت برداشته شده و به آن ۵۰۰ میکرولیتر از محلول تیوباربتوریک اسید (TBA) ۱۲/۶۷ درصد اضافه شد. محلول به مدت ۱۰ دقیقه در حمام جوش قرار داده شد. پس از سرد شدن، جذب این محلول در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه ELISA Reader (Organon-Teknika, Netherland) خوانده شد و غلظت آن پس از مقایسه با منحنی استاندارد محاسبه گردید.

جدول ۱) مقایسه گروه‌های مطالعه از نظر شاخص‌های کیفی سمن			
گروه‌های مطالعه	میانگین تعداد اسپرم $\pm$ انحراف معیار (n=۷) ($\times 10^6$)	میانگین درصد اسپرم‌های دارای انواع بدشکلی $\pm$ انحراف معیار (n=۷)	میانگین درصد اسپرم‌های زنده $\pm$ انحراف معیار (n=۷)
گروه کنترل (Cnt)	۷۴/۵۷ $\pm$ ۳/۲۵۰	۲۳/۷۱ $\pm$ ۲/۳۰۶	۸۷/۱۴ $\pm$ ۲/۸۱۵
گروه دیازینون (DZN)	۷۱/۴۳ $\pm$ ۳/۰۰۷	۲۹/۱۴ $\pm$ ۲/۸۴۰	۸۴/۱۴ $\pm$ ۲/۱۰۹
گروه تیموکینون (TQ)	۷۲/۱۴ $\pm$ ۳/۰۵۱	۲۱/۴۳ $\pm$ ۳/۲۲۸	۸۷/۸۶ $\pm$ ۲/۲۸۳
گروه تیموکینون + دیازینون (TQ+DZN)	۷۱/۸۶ $\pm$ ۳/۵۴۲	۲۶/۲۹ $\pm$ ۲/۱۷۹	۸۵/۵۷ $\pm$ ۲/۱۷۰

کنترل گردید ($p < 0/0001$). همچنین نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تجویز ۵ روزه تیموکینون با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، تغییر معنی‌داری بر تحرک

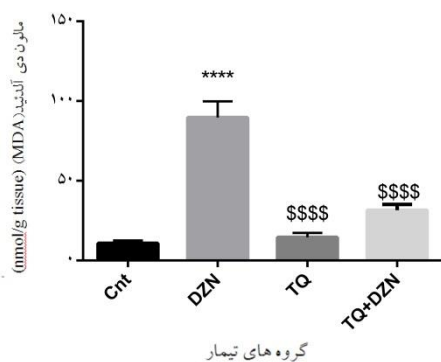
مطابق نمودار ۱، تجویز تک دوز دیازینون با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم درموش صحرایی، موجب افزایش معنی‌دار درصد اسپرم‌های فاقد تحرک نسبت به گروه

¹⁰ Malondialdehyde

¹¹ Trichloroacetic Acid

¹² Trichloroacetic Acid

با تجویز ۵ روزه تیموکینون با دوز میلی گرم بر کیلوگرم ۱۰، ۳ روز قبل از تجویز دیازینون با دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم، سطح MDA در بافت بیضه حیوانات در این گروه نسبت به گروهی که تنها دیازینون دریافت کرده‌اند کاهش معنی داری داشته است ($p < 0.0001$).



نمودار ۲) تغییرات میزان مالون دی آلدئید (MDA) بافت بیضه در گروه‌های مختلف

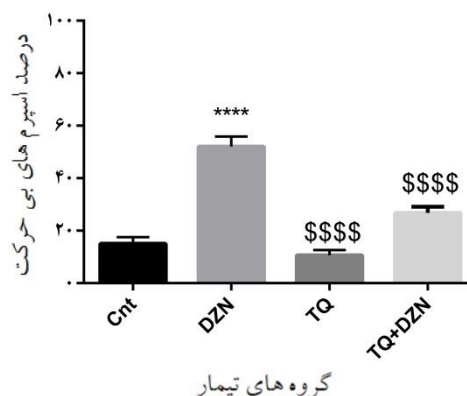
Fig 2) MDA level changes in testicular tissue of different groups

Cnt: کنترل، TQ: گروه دریافت کننده تیموکینون با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم، DZN: گروه دریافت کننده دیازینون با دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم و TQ+DZN: گروه دریافت کننده توأم تیموکینون و دیازینون هر یک از ستون‌ها نمایانگر میانگین $\pm$ خطای معیار میزان MDA بافت بیضه برحسب میکرومول در هر گرم بافت برای ۷ سر موش می‌باشد. **** اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل (Cnt) ($p < 0.0001$) **** اختلاف معنی دار نسبت به گروه دیازینون (DZN) ($p < 0.0001$)

بحث

در این مطالعه اثرات پیش درمانی با تیموکینون به عنوان یکی از مهم‌ترین اجزای مؤثره گیاه سیاه دانه (*L. Nigella sativa*) در برابر آثار زیان‌آور سم ارگانوفسفره دیازینون بر دستگاه تولیدمثلی موش صحرایی نر و کیفیت سمن آن مورد بررسی قرار گرفت. برخی از اثرات نامطلوب دیازینون بر سیستم تولید مثل موش صحرایی نر که در مطالعات قبلی نیز مورد بررسی

اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل ندارد. به‌علاوه تجویز ۵ روزه تیموکینون با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم، ۳ روز قبل از تجویز دیازینون با دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم، درصد اسپرم‌های فاقد تحرک در این گروه را نسبت به گروهی که تیموکینون دریافت نکرده و صرفاً دیازینون دریافت کرده‌اند به‌طور معنی داری کاهش داده است ($p < 0.0001$).



نمودار ۱) مقایسه درصد اسپرم‌های بی‌حرکت در گروه‌های مختلف

Fig 1) comparison of unmoved sperm percentage in different groups

Cnt: کنترل، TQ: گروه دریافت کننده تیموکینون با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم، DZN: گروه دریافت کننده دیازینون با دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم و TQ+DZN: گروه دریافت کننده توأم تیموکینون و دیازینون هر یک از ستون‌ها نمایانگر میانگین $\pm$ خطای معیار برای ۷ سر موش می‌باشد. **** اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل (Cnt) ($p < 0.0001$) **** اختلاف معنی دار نسبت به گروه دیازینون (DZN) ($p < 0.0001$)

مطابق نتایج حاصل که در نمودار ۲ نشان داده شده است، در گروهی که تک دوز دیازینون را به صورت تزریق داخل صفاقی با دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کرده‌اند نسبت به گروه کنترل، سطح MDA در بافت بیضه حیوانات افزایش معنی داری داشته است ($p < 0.0001$). در گروهی که تجویز ۵ روزه تیموکینون با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم را دریافت نموده‌اند، تفاوت معنی داری در سطح MDA در بافت بیضه حیوانات نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. همچنین

و تأیید قرار گرفته است، عبارتند از افزایش میزان MDA و کاهش گلوتاتیون (GSH) در بافت بیضه (۲) و کاهش کیفیت سمن از جمله افزایش بدشکلی و کاهش تحرک اسپرم‌ها است (۱۲). در این مطالعه جهت بررسی آثار سمیت حاد دیازینون، به صورت تک دوز از این ماده شیمیایی استفاده شد، به نحوی که شرایط مواجهه اتفاقی و غیر مستمر افراد با این سم را مورد توجه و بررسی قرار داد.

در مطالعات مختلف از جمله مطالعه رحیمی و همکاران مشخص شد که دیازینون منجر به افزایش ROS و پراکسیداسیون لیپیدی می‌گردد که به شکل افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید و کاهش گلوتاتیون (GSH) بروز می‌یابد (۲). با افزایش سطح واکنش‌های استرس اکسیداتیو شاخص‌های کیفی سمن از جمله تعداد، مورفولوژی، تحرک و توان زنده ماندن اسپرم‌ها که از مهم‌ترین فاکتورهای عملکردی اسپرم است تغییر می‌کند که منجر به ناکارآمدی توان تولیدمثلی حیوان (یا انسان) می‌گردد (۱۸). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که دیازینون می‌تواند به عنوان یک عامل القاء کننده واکنش‌های استرس اکسیداتیو قوی عمل کند. این یافته در راستای مطالعاتی است که قبلاً در همین رابطه انجام شده است (۲). از طرفی تحرک اسپرم موش صحرایی در حضور دیازینون کاهش یافت که در تطابق با برخی از مطالعات قبلی است (۱۲). مکانیزم احتمالی در این رابطه می‌تواند بهم خوردن ساختارهای غشایی اسپرم از جمله تغییر سیالیت غشاء ناشی از تخریب لیپیدهای غشایی و نیز اختلال در کارکرد پروتئین‌های حرکتی موجود در اگزوزم باشد (۱۹ و ۲۰).

با عنایت به اینکه چرخه زیستی اسپرماتوزوئیدها در موش صحرایی بین ۴۵ تا ۶۰ روز می‌باشد (۲۱)، استفاده از دیازینون به صورت حاد، با اینکه تحرک اسپرم‌های

بالغ را کاهش می‌دهد ولی تأثیری بر مراحل اولیه تکثیر و تکامل اسپرماتوزوئیدها نداشته است. احتمال داده می‌شود که تک دوز دیازینون برای تأثیرگذاری بر مراحل اولیه تکثیر و تکامل اسپرماتوزوئیدها ناکافی است و به زمان یا نوبت‌های تکرار بیشتری نیاز است تا سایر مراحل چرخه تولید و تکامل اسپرم‌ها نیز تحت تأثیر آثار زیان آور دیازینون قرار گیرند.

از سوی دیگر در مطالعات متعددی خواص تیموکیون از جمله توانایی آنتی اکسیدانی آن مورد بررسی قرار گرفته است (۱۱ و ۱۲). فواد (Fouad)، نشان داده است که تجویز داخل صفاقی تیموکیون با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۵ روز پیایی می‌تواند میزان MDA القاء شده با کادمیوم را در بیضه موش صحرایی کاهش داده و منجر به افزایش گلوتاتیون و SOD شود (۱۱). در پژوهشی مشخص شده است که تیموکیون اثرات حفاظتی بر حرکت اسپرم در برابر آسیب‌های القا شده توسط مورفین دارد. غشا اسپرم پستانداران حاوی میزان زیادی اسیدهای چرب اشباع نشده است که به پراکسیداسیون لیپیدی حاصل از استرس اکسیداتیو حساس هستند. پراکسیداسیون سبب از دست رفتن ATP و کاهش حرکت اسپرم می‌شود. بنابراین اثر مورفین بر کاهش تحرک اسپرم به قدرت این ماده در القاء استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی نسبت داده شده است و نقش حفاظتی تیموکیون در برابر مورفین مربوط به خواص آنتی اکسیدانی و توانایی آن در کاهش رادیکال‌های آزاد است (۲۲). در این مطالعه تیموکیون از کاهش میزان تحرک اسپرم‌ها توسط دیازینون جلوگیری کرده است نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز ۵ روزه تیموکیون قبل از استفاده از دیازینون، می‌تواند سطح MDA را در بافت بیضه موش صحرایی کاهش داده و سلول‌های بافت بیضه را در برابر

عوامل اکسیداتیو القاء شده توسط دیازینون محافظت نماید. این نتایج در توافق با سایر مطالعات قبلی است که نشان دهنده اثرات مثبت انواع مواد آنتی اکسیدان علیه مواد زیان آور مؤثر بر اسپرم‌ها است (۲۳ و ۲۴).

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه می‌توان نتیجه گرفت که تجویز تک دوز دیازینون (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر عملکرد فیزیولوژیک دستگاه تولید مثلی موش صحرایی نر از جمله قدرت تحرک اسپرم اثر منفی داشته و درصد اسپرم‌های متحرک را کاهش می‌دهد. این اثرات احتمالاً ناشی از افزایش سطح واکنش‌های استرس اکسیداتیو در بدن و بافت بیضه است که به صورت افزایش میزان MDA در بافت بیضه قابل مشاهده است. تیموکینون به

عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان، می‌تواند از بروز این آثار زیان‌آور از جمله افزایش سطح MDA در بافت بیضه ناشی از تجویز دیازینون جلوگیری و منجر به افزایش کیفیت سمن نسبت به گروه در معرض دیازینون گردد.

سپاس و قدردانی

این مقاله بر گرفته از پایان نامه خانم لیلا تاجیک مصوب دانشگاه پیام نور می‌باشد. لازم به ذکر است مقاله حاضر از نظر مالی تحت حمایت هیچ سازمانی نمی‌باشد.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1. Pina-Guzman B, Solis-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B. Diazinon Alters Sperm Chromatin Structure In Mice By Phosphorylating Nuclear Protamines. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 202(2): 189-98.
2. Rahimi Anbarkeh F, Nikravesht MR, Jalali M, et al. Single Dose Effect Of Diazinon On Biochemical Parameters In Testis Tissue Of Adult Rats And The Protective Effect Of Vitamin E. *Iran J Reprod Med* 2014; 12(11): 731-6.
3. Oruc E. Effects Of Diazinon On Antioxidant Defense System And Lipid Peroxidation In The Liver Of Cyprinus Carpio (L.). *Environ Toxicol* 2011; 26(6): 571-8.
4. Shah MD, Iqbal M. Diazinon-Induced Oxidative Stress And Renal Dysfunction In Rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(12): 3345-53.
5. Perez-Herrera N, Polanco-Minaya H, Salazar-Arredondo E, et al. PON1Q192R Genetic Polymorphism Modifies Organophosphorous Pesticide Effects On Semen Quality And DNA Integrity In Agricultural Workers From Southern Mexico. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 230(2): 261-8.
6. Swan SH, Kruse RL, Liu F, et al. Semen Quality In Relation To Biomarkers Of Pesticide Exposure. *Environ Health Perspect* 2003; 111(12): 1478-84.
7. Darakhshan S, Bidmeshki Pour A, Hosseinzadeh Colagar A, et al. Thymoquinone And Its Therapeutic Potentials. *Pharmacol Res* 2015; 95-96: 138-58.
8. Goyal SN, Prajapati CP, Gore PR, et al. Therapeutic Potential And Pharmaceutical Development Of Thymoquinone: A Multitargeted Molecule Of Natural Origin. *Front Pharmacol* 2017; 8: 656.
9. Halliwell B. Free Radicals And Antioxidants: Updating A Personal View. *Nutr Rev* 2012; 70(5): 257-65.
10. Tomokuni K, Hasegawa T, Hirai Y, et al. The Tissue Distribution Of Diazinon And The Inhibition Of Blood Cholinesterase Activities In Rats And Mice Receiving A Single

- Intraperitoneal Dose Of Diazinon. Toxicology 1985; 37(1-2): 91-8.
11. Fouad AA, Jresat I. Thymoquinone Therapy Abrogates Toxic Effect Of Cadmium On Rat Testes. Andrologia 2015; 47(4): 417-26.
 12. Toman R, Hluchy S, Cabaj M, et al. Effect Of Separate And Combined Exposure Of Selenium And Diazinon On Rat Sperm Motility By Computer Assisted Semen Analysis. J Trace Elem Med Biol 2016; 38: 144-9.
 13. Ola-Mudathir KF, Suru SM, Fafunso MA, et al. Protective Roles Of Onion And Garlic Extracts On Cadmium-Induced Changes In Sperm Characteristics And Testicular Oxidative Damage In Rats. Food Chem Toxicol 2008; 46(12): 3604-11.
 14. Cooper TG, Noonan E, Von Eckardstein S, et al. World Health Organization Reference Values For Human Semen Characteristics. Hum Reprod Update 2010; 16(3): 231-45.
 15. Noroozzadeh M, Ramezani Tehrani F, Zadeh-Vakili A, et al. The effects of testosterone intra-uterine disturbance on sperm quality and testis tissue in male rat, s offspring after puberty. Iran South Med J 2016; 19(3): 372-84.
 16. Halvaei I, Roodsari HS, Harat ZN. Acute Effects Of Ruta Graveolens L. On Sperm Parameters And DNA Integrity In Rats. J Reprod Infertil 2012; 13(1): 33-8.
 17. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination Of Aldehydic Lipid Peroxidation Products: Malonaldehyde And 4-Hydroxynonenal. Methods Enzymol 1990; 186: 407-21.
 18. Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, et al. Oxidative Stress And Male Infertility. Nat Rev Urol 2017; 14(8): 470-85.
 19. Greil AL, Slauson-Blevins K, Mcquillan J. The Experience Of Infertility: A Review Of Recent Literature. Sociol Health Illn 2010; 32(1): 140-62.
 20. Tvrdá E, Knazicka Z, Bardos L, et al. Impact Of Oxidative Stress On Male Fertility - A Review. Acta Vet Hung 2011; 59(4): 465-84.
 21. Hikim AP, Maiti BR, Ghosh A. Spermatogenesis In The Bandicoot Rat. I. Duration Of The Cycle Of The Seminiferous Epithelium. Arch Androl 1985; 14(2-3): 151-4.
 22. Salahshoor MR, Haghjoo M, Jalali C, et al. Effect Of Thymoquinone On Reproductive Parameter In Morphine-Treated Male Mice. Adv Biomed Res 2018; 7: 18.
 23. Agarwal A, Roychoudhury S, Bjugstad KB, et al. Oxidation-Reduction Potential Of Semen: What Is Its Role In The Treatment Of Male Infertility?. Ther Adv Urol 2016; 8(5): 302-18.
 24. Majzoub A, Agarwal A. Antioxidant Therapy In Idiopathic Oligoasthenozoospermia. Indian J Urol 2017; 33(3): 207-14.

Original Article

The Effects of Thymoquinone on Semen Quality in the Diazinon Exposed Rats

L. Tajik (MSc)^{1*}, S. Nasri (PhD)^{1**}, E. Raeis-Abdollahi (PhD)²

¹ Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

² Department of Physiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received 13 Aug, 2019)

Accepted 31 Dec, 2019)

Abstract

Background: Exposure to organophosphate pesticides, including diazinon, can lead to increased production of free radicals and decreased cellular antioxidant capacity and male infertility. Thymoquinone (TQ) is an active component of *Nigella sativa* with well documented antioxidant effects. This study evaluated the effects of thymoquinone on oxidative stress induced by exposure to diazinon and semen quality in male rats.

Materials and Methods: Twenty-eight male Wistar rats weighing 200-300 g were randomly divided into four groups (n=7, each). The first (control) group received a single intraperitoneal (i.p.) injection of olive oil (medication vehicle). Testicular toxicity was induced in rats of the second and third groups by a single injection of diazinon (20 mg/kg, i.p.). Also, the animals of the second and third groups received the vehicle of TQ (olive oil) or TQ (10 mg/kg/day, i.p.), respectively, for five consecutive days starting 3 days before diazinon administration. The fourth group of animals received thymoquinone (10 mg/kg/day) for five consecutive days without induction of diazinon toxicity. Thirty-six hours later, semen quality was assessed for motility, morphology, and viability of sperms in addition to measurement of malondialdehyde (MDA) level in testis tissue.

Results: The results showed that the sperm motility significantly decreased and MDA level significantly increased ($P<0.0001$) after diazinon exposure whereas thymoquinone increased sperm motility and decreased MDA level ($P<0.0001$) in testis tissue after exposure to diazinon as compared to the control group.

Conclusion: Since diazinon increases lipid peroxidation in sperm plasma membrane through production of free radicals, it can be concluded that administration of thymoquinone as an antioxidant can prevent diazinon toxicity in testis tissue of rats, and improve the quality of semen.

Keywords: Semen quality, Thymoquinone, Diazinon, Lipid peroxidation, Male Rat

©Iran South Med J. All right reserved

Cite this article as: Tajik L, Nasri S, Raeis-Abdollahi E. The Effects of Thymoquinone on Semen Quality in the Diazinon Exposed Rats. Iran South Med J 2020; 22(5): 505-514

Copyright © 2020 Tajik, et al This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

**Address for correspondence: Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran. Email: s_nasri2000@yahoo.com

*ORCID: 0000-0001-6409-1907

**ORCID: 0000-0001-7849-6315

Website: <http://bpums.ac.ir>

Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>