Research Paper

Effect of Crocin on Bax, Bcl2, and Oxidative Stress Indices in Testicular Tissue of Streptozotocin Diabetic Rats

Ghazal Ataei[1], ***Raheleh Rahbarian**[1], **Majid Rajabian Noghondar**[1]

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Ataei Gh, Rahbarian R, Rajabian Noghondar M. [Investigating the Effect of Crocin on Bax and Bcl-2 and Oxidative Stress levels in Testis Tissue of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats (Persian)]. Quarterly of "The Horizon of Medical Sciences". 2019; 25(4):340-351. https://doi.org/10.32598/hms.25.4.340

https://doi.org/10.32598/hms.25.4.340

CC BY NC

Received: 17 Jan 2019
Accepted: 17 Apr 2019
Available Online: 01 Oct 2019

Key words:
Crocin, Bax protein, Bcl2 proteins, Testicle, Diabetes mellitus, Rat

ABSTRACT

Aims Type 1 diabetes is a high-prevalent endocrine disease and causes oxidative stress in the testis tissue. In the treatment of diabetes, the tendency toward herbal medicines use is increasing. This study aimed to investigate the crocin effect on the Bax, Bcl2 (B-cell lymphoma 2), and anti-oxidant levels of streptozotocin-induced diabetic rats.

Methods & Materials This experimental study was performed at Payam Noor University. In total, 24 rats were divided into 4 groups, as follows: control, untreated diabetic, and 2 crocin-treated (50, 100 mg/mL, 25 days intraperitoneal injection) diabetic groups. The diabetic groups were diabetic rats receiving the Intraperitoneal (IP) injection of Streptozotocin (STZ). On day 25, the testicles were dissected to evaluate antioxidant enzymes, Bax and Bcl2. The obtained results were analyzed in SPSS using One-Way Analysis of Variance (ANOVA) and Least Significant Difference (LSD) test.

Findings The pro-apoptotic Bax and malondialdehyde levels in the treated group with a concentration of 100 mg/mL of crocin was significantly reduced, compared to the treated group with a concentration of 50 mg/mL of crocin and the control group. However, the level of pro-apoptotic Bcl-2 and glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase enzymes in the treated group with a concentration of 100 mg/mL of crocin significantly increased, compared to the treated group with a concentration of 50 mg/mL of crocin, and the control group ($P<0.05$). Such finding indicates the effect of crocin concentration. Additionally, crosin significantly reduced the glucose level in diabetic rats.

Conclusion Crocin improved the antioxidant indicators and diabetes-induced damages in the testis tissue of diabetic rats.

Extended Abstract

1. Introduction

Diabetes is one of the most important endocrine diseases in human society that has long been associated with specific side effects such as nephropathy, retinopathy, neuropathy, fertility decline, ovarian diameter decrease, erectile dysfunction, sperm motility, and testicular tissue changes [1].

The population with diabetes is on the rise and threatens developed countries such as the United States and, at the same time, threatens developing countries, causing cardiovascular disease, blindness, renal failure, and so on [2].

* *Corresponding Author:*
Raheleh Rahbarian, PhD.
Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran.
Tel: +98 (915) 3518157
E-mail: ra_rahbarian@yahoo.com

Nowadays, research on medicinal plants with the aim of achieving new and effective compounds is a top priority. Many plants are a rich source of natural antioxidants and can reduce the effects of oxidants and the effects of some diseases such as diabetes.

A study by Aricav et al. (2006) found that in diabetic rats, testosterone and LH levels were significantly decreased in alloxan-treated diabetic groups compared to the healthy control group, indicating an effect of diabetes on the reduction of male hormones [12]. Other research has also shown that high blood sugar levels can affect sperm quality and thus reduce the fertility potential in men [13].

2. Methods

In this experimental study, carried out in Payam-e-Noor University in 2018, 24 rats weighing 195±4 g and approximate age of 95±3 days were used. Animals were kept in standard polycarbonate cages (Razi Rad, Iran) at 24±3°C, 35±4% of relative humidity, and a 12-h light-dark period. They watered sufficiently in 500 ml plastic bottles and fed with a standard formula food for rats (Daneh-Daran Toes, Iran). In order to adapt to the environment, the experiments started at least 10 days after the animals were housed.

In this study, all surgeries and sampling were performed under complete anesthesia. It was also attempted to use the least acceptable sample size. All laboratory animal rights in the study for human use based on international guidelines for the care and use of laboratory animals were respected.

3. Results

The results of the study showed that the tissue level of Bax indices and the amount of malondialdehyde in the diabetic control group were significantly increased compared to the healthy control group. The amount of Bcl2 and superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase were significantly decreased in the diabetic control group ($P<0.05$). Tissue expression of the Bcl2 index in treating diabetic groups with 50 mg/ml crocin was not significantly different from the control diabetic group, but the glutathione peroxidase enzyme increased significantly in treating diabetic group with 50 mg/ml crocin ($P<0.05$).

4. Discuss

In this study, the effect of crocin on sperm parameters in diabetic rats was investigated. Factors contributing to the increase in oxidative stress in diabetic patients include the reduction of antioxidants such as superoxide dismutase and glutathione peroxidase. The level of malondialdehyde in healthy subjects is lower than in diabetic subjects and the level of antioxidant enzymes is higher than in diabetic subjects [25].

Based on the results, crocin at a concentration of 100 mg/ml significantly increased the mean percentage of antioxidant enzymes such as catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase compared to the diabetic control group; it also significantly reduced the amount of malondialdehyde ($P<0.05$).

Given that all mice in the experimental group were treated with crocin and the diabetic control group by streptozotocin, improvement in catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and Bcl2 index tissue expression in the crocin-treated experimental group could be attributed to the effective compositions in this plant.

Research has shown that crocin has high antioxidant properties and increases blood insulin levels and low blood sugar levels in diabetic samples, and so far no adverse effects of crocin on the liver and kidney tissue have been reported [6].

5. Conclusion

Crocin at a concentration of 100 mg/ml was able to decrease the tissue expression index of Bax and significantly increased the tissue expression of Bcl2 as well as antioxidant enzymes such as catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase compared to diabetic control group; it also improved the damages induced by diabetes in the testicular tissues of the rats.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study has obtained its ethical approval from the Research Ethics Committee of Neyshabur University of Medical Sciences (Code: IR.NUMS.REC.1395.47). All experiments on animals in this study was according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Funding

This study received no financial support from any organization.

Authors' contributions

All authors contributed equally in preparing all parts of the research.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

بررسی اثر کروسین بر میزان Bcl2، Bax و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت بیضه موش‌های صحرایی دیابتی‌شده با استرپتوزوتوسین

غزال عطائی[1]، *راهله رهباریان[1]، مجید رجبیان نقندر[1]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۲۷ دی ۱۳۹۷
تاریخ پذیرش: ۲۸ فروردین ۱۳۹۸
تاریخ انتشار: ۰۹ مهر ۱۳۹۸

چکیده

اهداف دیابت نوع اول از شایع‌ترین بیماری‌های غدد درون‌ریز است و باعث استرس‌های اکسیداتیو در بافت بیضه می‌شود. امروزه در درمان دیابت گرایش به سوی داروهای گیاهی روزبه‌روز گسترش می‌یابد. این مطالعه با هدف بررسی اثرات کروسین بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانت و میزان Bax و Bcl2 در موش‌های صحرایی انجام شد.

مواد و روش‌ها در این مطالعه تجربی که در دانشگاه پیام نور انجام شد، ۲۴ سر موش صحرایی به چهار گروه کنترل، کنترل دیابتی، دیابتی تحت تیمار با کروسین (۵۰ و ۱۰۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۲۵روز تزریق داخل صفاقی) تقسیم شدند. گروه‌های دیابتی با یک بار تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین دیابتی شدند. در روز ۲۵ آزمایش، بیضه موش‌ها به منظور ارزیابی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و شاخص‌های Bax و Bcl2 خارج شد. نتایج توسط نسخه ۲۰ نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی LSD تحلیل شدند.

یافته‌ها سطح بافتی شاخص Bax و مقدار مالون‌دی‌آلدئید در گروه تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین در مقایسه با گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین و گروه کنترل دیابتی کاهش معنی‌داری داشت؛ همچنین در مقدار سطح بافتی شاخص Bcl2 و آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در گروه تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین نسبت به گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین و گروه کنترل دیابتی افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($P<0/05$) که نشان‌دهنده اثر وابسته به غلظت کروسین است. همچنین کروسین سبب کاهش معنی‌داری در میزان قند خون موش‌های دیابتی شد.

نتیجه‌گیری کروسین موجب بهبود شاخص‌های آنتی اکسیدانی و همچنین آسیب‌های ایجاد شده توسط دیابت در بافت بیضه موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود.

کلیدواژه‌ها:
کروسین، Bcl2 ،Bax، بیضه، موش صحرایی، دیابت

مقدمه

دیابت از مهم‌ترین بیماری‌های غدد درون‌ریز در جوامع انسانی است که در درازمدت با عوارض جانبی خاص مانند: نفروپاتی، رتینوپاتی، نوروپاتی، کاهش باروری، کاهش قطر تخمدان، اختلالات نعوظ، کاهش تحرک اسپرم و تغییرات بافتی بیضه همراه است [۱]. جمعیت افراد مبتلا به دیابت رو به افزایش است و کشورهای توسعه‌یافته مانند ایالات متحده و کشورهای در حال توسعه را تهدید می‌کند و باعث بیماری‌های قلبی‌عروقی، کوری، نارسایی کلیوی و غیره می‌شود [۲]. دیابت در بروز ناباروری و اختلالات هورمونی در مردان نقش مهمی دارد و مشخص شده است در نتیجه دیابت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در بافت بیضه تضعیف شده و توانایی آن در محافظت بافت بیضه در برابر آسیب‌های اکسیداتیو کاهش می‌یابد. تضعیف دفاع آنتی‌اکسیدانی به افزایش تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن[1] در مایع منی منجر می‌شود و درنهایت موجب آسیب رسیدن به سلول‌های زایا می‌شود [۳، ۴].

مایع منی در افراد سالم حاوی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند آسکوربات، آلفاتوکوفرول و پیروات است که نقش حفاظت از اسپرماتوزوا در برابر استرس‌های اکسیداتیو را به عهده دارند [۴]. در شرایط طبیعی رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولیدشده در مایع منی توسط آنتی‌اکسیدان‌های موجود در مایع منی غیرفعال می‌شود؛ درنتیجه یکی از دلایل ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو و نقص

1. Reactive Oxygen Species (ROS)

* نویسنده مسئول:
دکتر راهله رهباریان
نشانی: تهران، دانشگاه پیام نور، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی.
تلفن: ۳۵۱۸۱۵۷ (۹۱۵) ۹۸+
پست الکترونیکی: ra_rahbarian@yahoo.com

عملکرد اسپرماتوزوا به دلیل عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و غیرفعال‌شدن آن توسط آنتی‌اکسیدان‌هاست [۴]. این احتمال نیز وجود دارد که افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن سرانجام باعث کاهش فسفوریلاسیون پروتئین‌های آکسونمی و عدم تحرک اسپرم شود که این موجب کاهش سیالیت غشا و درنهایت اختلال در لقاح اسپرم و اووسیت می‌شود [۳].

فشرده‌بودن DNA و حضور آنتی‌اکسیدان‌ها در مایع منی، DNA اسپرم را از آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند. در افراد مبتلا به دیابت با توجه به اینکه DNA اسپرم در معرض غلظت بالای رادیکال‌های آزاد اکسیژن قرار دارد، موجب قطعه‌قطعه شدن آن می‌شود و همچنین پایین‌بودن سطح آنتی‌اکسیدان‌ها در مایع منی و تولید بیش از اندازه رادیکال‌های آزاد اکسیژن، باعث ایجاد ساختار غیرطبیعی در اسپرم افراد مبتلا به دیابت می‌شود [۵].

دیابت ناشی از استرپتوزوتوسین[۲] در موش‌های صحرایی، دیابت نوع ۱ است. عصاره زعفران سطح انسولین سرم را در موش‌های دیابتی و غیردیابتی افزایش می‌دهد و موجب بازسازی سلول‌های β در موش‌های دیابتی با استرپتوزوتوسین می‌شود [۶]. افزایش طولانی‌مدت گلوکز، دلیل اصلی آغاز زنجیره‌ای از واکنش‌های شیمیایی و تشکیل محصولات پیشرفته Glycation[۳] است [۷]. استرس‌های اکسیداتیو به معنای افزایش تولید رادیکال‌های آزاد یا کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و یا هردوست. در بیماری دیابت، افزایش آپوپتوز در بافت بیضه رخ می‌دهد که از نشانه‌های بارز آن افزایش سطح بافتی شاخص Bax[۴] و کاهش سطح بافتی شاخص Bcl2[۵] در بافت بیضه است که در جهت تشدید آپوپتوز عمل می‌کند. خانواده پروتئین Bcl2 که با ژن Bcl2 کدگذاری می‌شود به‌خوبی شناخته شده است و در علائم بقا یا مرگ‌ومیر در اثرات سلولی دیابت نقش دارد و یک پروتئین آنتی‌آپوپتوتیک است و می‌تواند از آسیب‌های سیتوتوکسیتی جلوگیری کند [۸، ۹].

پروتئین Bax یا پروتئین X وابسته به Bcl2 پروتئین تنظیم‌کننده آپوپتوز است که با ژن Bax رمزگذاری می‌شود و در زمان آسیب به ارگان‌ها از بین می‌رود؛ همچنین باعث القای سیگنال‌های مختلف سلولی می‌شود، پس غلظت این پروتئین‌ها مهم‌ترین عامل در سرنوشت سلولی است [۹، ۱۰]. Bax برای آپوپتوز در سلول‌های طبیعی ضروری است؛ بنابراین بیان بیش از حد Bcl-2 موجب افزایش بقای سلولی می‌شود که با سرکوب آپوپتوز در سلول‌هایی که تحت محرک القای آپوپتوز قرار دارند همراه است [۱۱].

امروزه مطالعه روی گیاهان دارویی با هدف رسیدن به ترکیبات جدید و مؤثر در اولویت قرار گرفته است. بسیاری از گیاهان منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند و می‌توانند اثرات ناشی از اکسیدان‌ها و عوارض برخی از بیماری‌ها مانند دیابت را کاهش دهند. تحقیقاتی که توسط آریکاو و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام شد، نشان می‌دهد در موش‌های دیابتی مقدار تستوسترون و LH در گروه‌های دیابتی‌شده با آلوکسان در مقایسه با گروه شاهد سالم، کاهش معنی‌داری دارد که این نشان‌دهنده تأثیر دیابت بر کاهش مقدار هورمون‌های مردانه است [۱۲]. همچنین تحقیقات دیگر نشان می‌دهد سطح بالای قند خون ممکن است بر کیفیت اسپرم تأثیر بگذارد و بنابراین پتانسیل باروری در مردان را کاهش دهد [۱۳].

ریس و همکاران در سال ۲۰۰۹ دریافتند دیابت وابسته به انسولین با کاهش میزان اسپرم همراه است و باعث کاهش قدرت و تحرک اسپرماتوزا می‌شود [۱۴]. تحقیقات دیگری نیز در این زمینه انجام شده، ولی طبق مطالعات صورت‌گرفته در هیچ‌یک به بررسی میزان سطح بافتی شاخص Bax و Bcl2 در بافت بیضه موش‌های دیابتی پرداخت نشده است [۱۱، ۱۵-۱۷].

خواص هیپوگلیسمی[۶] بسیاری از گیاهان دارویی در مدل‌های حیوانی و مطالعات بالینی بررسی و تأیید شده است [۱۸]. یکی از گیاهان دارویی بسیار مهم، کروکوس ساتیووس[۷] از تیره زنبقیان[۸] است که به نام‌های زعفران یا زرپران شناخته می‌شود [۱۹]. زعفران، گیاهی چندساله در ایران، هند و یونان است که خواص زیادی از قبیل خواص دارویی، رنگی و غذایی دارد. زعفران یک افزاینده غذاست که به عنوان دارو در طب سنتی استفاده می‌شود و خاصیت ضدانعقادی، ضدافسردگی، ضدالتهابی، ضدتومور، بهبود حافظه و یادگیری، ضد فشار خون و غیره دارد [۲۰].

اخیراً گزارش شده که کروسین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی است. سافرانال و کروسین دو ترکیب مهم و اصلی زعفران‌اند و خواص اصلی زعفران به دلیل وجود این دو ماده است. کروسین حساسیت به انسولین را افزایش می‌دهد و ناهنجاری‌های مرتبط با آن را بهبود می‌بخشد [۶]. یکی از این ناهنجاری‌ها زخم‌های گوارشی است که کیانبخت و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند عصاره زعفران در بهبود زخم‌های گوارشی و جلوگیری از آسیب‌های مخاطی ناشی از دیابت بسیار مؤثر است [۲۱].

هایپرگلیسمی در دیابت نوع ۱ و ۲ اتفاق می‌افتد و موجب استرس‌های اکسیداتیو می‌شود. سمرقندیان و همکاران نشان دادند عصاره زعفران اثرات متابولیکی ناگوار ناشی از هایپرگلیسمی و دیابت را از بین می‌برد [۸]. هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر گیاهان دارویی بر سلامت انسان‌ها و درمان بیماری‌هاست و

2. Streptozotocin (STZ)
3. Advanced Glycation End Products (AGES)
4. Bcl2 Associated X (BAX)
5. B-cell lymphoma 2 (BCL2)
6. Hypoglycemia
7. Crocus sativus
8. Iridaceae

ضرورت انجام این پژوهش از آنجا احساس می‌شود که دیابت یکی از بیماری‌هایی است که انسان‌های زیادی به آن مبتلا هستند و موجب مشکلات بسیاری از جمله مشکلات ناباروری می‌شود؛ از طرفی استفاده از داروهای شیمیایی برای سلامت انسان‌ها مضر است و همچنین امکان استفاده از گیاهانی مانند زعفران که بومی ایران هستند، میسر است؛ بنابراین در این پژوهش به بررسی اثر کروسین بر میزان Bcl2، Bax و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت بیضه موش‌های صحرایی دیابتی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۷ در دانشگاه پیام نور انجام شد تعداد ۲۴ سر موش صحرایی با محدوده وزنی ۴±۱۹۵ گرم و سن تقریبی۳±۹۵ روز تهیه شد. حیوانات در دمای ۳±۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۴±۳۵ درصد و دوره روشنایی‌تاریکی ۱۲ساعته در قفس‌های استاندارد پلی‌کربنات شفاف (رازی راد، ایران) نگهداری شدند و آب به مقدار کافی توسط بطری پلاستیکی ۵۰۰ میلی‌لیتر در اختیار آن‌ها قرار داده شد. همچنین از غذای فشرده مخصوص موش با فرمول استاندارد (دانه‌داران توس، ایران) تغذیه کردند. به منظور حصول حالت سازش با محیط، آزمایش‌ها پس از گذشت حداقل ۱۰ روز پس از استقرار حیوانات به انجام رسید. در این مطالعه کلیه اعمال جراحی و نمونه‌گیری‌ها تحت بیهوشی کامل انجام شد. همچنین سعی شده است از کمترین تعداد نمونه قابل قبول استفاده شود. رعایت تمامی حقوق حیوانات آزمایشگاهی در پژوهش برای استفاده انسانی مبتنی بر دستورالعمل‌های بین‌المللی مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی بود.

طراحی آزمایش و گروه‌بندی

موش‌های صحرایی به صورت تصادفی به چهار گروه (در هر گروه شش سر موش صحرایی) کنترل، کنترل دیابتی، دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین تقسیم شدند. موش‌های صحرایی گروه کنترل به مدت ۲۵ روز، به صورت داخل صفاقی، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سالین به عنوان حلّال دارو دریافت کردند. موش‌های صحرایی گروه کنترل دیابتی پس از القای دیابت تجربی توسط استرپتوزوتوسین با غلظت ۵۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش، به مدت ۲۵ روز به صورت داخل صفاقی، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سالین به عنوان حلال دارو دریافت کردند.

دو گروه دیگر موش‌های صحرایی پس از القای دیابت تجربی به مدت ۲۵ روز، ۰/۵ میلی‌لیتر غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به صورت داخل صفاقی، کروسین دریافت کردند.

ایجاد دیابت تجربی

مدل تجربی دیابت در موش‌های صحرایی به دنبال ۱۶ ساعت ناشتایی با یک بار تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین (Sigma-Aldrich, Germany) به میزان ۵۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ایجاد شد. همچنین از بافر سیترات (pH=۵/۴) به عنوان حلال استرپتوزوتوسین استفاده شد. تزریق استرپتوزوتوسین به گروه کنترل دیابتی و دو گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین صورت گرفت. با توجه به اینکه مطالعه، روی دیابت مزمن است، حدود سه روز پس از تزریق استرپتوزوتوسین جهت تأیید القای دیابت تجربی از ورید دمی خونگیری صورت گرفت و قند خون توسط دستگاه گلوکومتر مدل IGM-0002A (EasyGluco, Korea) اندازه‌گیری شد. همچنین قند خون بالای ۳۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به عنوان شاخص دیابتی‌شدن و روز صفر آزمایش در نظر گرفته شد [۲۲]. میزان قند خون موش‌ها قبل از دیابتی‌شدن و سپس در روزهای ۸، ۱۶ و ۲۴ پس از شروع تیماردهی نیز مجدد اندازه‌گیری شد. میانگین وزن موش‌های صحرایی نیز در هر گروه در روزهای ۱، ۸، ۱۶ و ۲۴ بعد از شروع تیماردهی سنجش شد.

اندازه‌گیری پارامترهای خونی

در پایان دوره تیمار، موش‌های صحرایی با دیاتیل اتر (Merck,Germany) بیهوش شدند سپس، بافت بیضه از بدن حیوان آزمایشگاهی خارج شد و پس از شست‌وشو با محلول سالین جهت سنجش پارامترهای مدنظر به آزمایشگاه منتقل شد. سطح بافتی پارامترهای موردبررسی توسط روش ELISA، دستگاه الایزاریدر مدل ۲۱۰۰ (Stat Fax, USA) و کیت‌های شرکت فاین تست (Finetest, China) سنجش شد.

سنجش‌ها بر اساس بازه و حساسیت هر پارامتر به این قرار است: شاخص سطح بافتی Bax با بازه ۲۰-۰/۳۱۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر و حساسیت <۰/۱۸۸؛ شاخص سطح بافتی Bcl2 با بازه۱۰-۰/۱۵۶ نانوگرم بر میلی‌لیتر و حساسیت <۰/۰۹۴؛ آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز با بازه ۵۰-۰/۷۸۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر و حساسیت <۰/۴۶۹؛ آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز با بازه۲۰۰۰-۳۱/۲۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و حساسیت <۱۸/۷۵، آنزیم کاتالاز با بازه ۲۰۰۰-۳۱/۲۰ واحد بین‌المللی میلی در هر میلی‌لیتر و حساسیت <۱۸/۷۵، مقدار مالون دی‌آلدئید با بازه ۵۰۰-۷/۸۱۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر و حساسیت <۴/۶۸۸ [۲۳، ۲۴].

تجزیه و تحلیل آماری

اطلاعات به‌دست‌آمده با نسخه ۲۰ نرم‌افزار آماری SPSS تحلیل شد. با توجه به اینکه نتایج به‌دست‌آمده کمّی است، توسط آزمون

کلوموگروف‌اسمیرنوف[9] فرض طبیعی‌بودن توزیع فراوانی داده‌ها بررسی شد. جهت مقایسه میانگین بین گروه‌های موردآزمایش از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه[10] و جهت مقایسه زوج گروه‌ها از آزمون تعقیبی LSD استفاده شد. همچنین نتایج به‌دست‌آمده به همراه محاسبات آماری مربوطه به صورت میانگین±انحراف معیار گزارش شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد (P<۰/۰۵).

یافته‌ها

نتایج حاصل از تحلیل داده‌های مطالعه حاضر نشان داد سطح بافتی شاخص‌های Bax و مقدار مالون دی‌آلدئید در گروه کنترل دیابتی در مقایسه با کنترل سالم به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. مقدار Bcl2 و آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در گروه کنترل دیابتی در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). سطح بافتی شاخص Bcl2 در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین در مقایسه با گروه کنترل دیابتی تفاوت معنی‌داری نداشت، ولی آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین به طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵).

افزایش میزان آنزیم کاتالاز نیز در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین نسبت به کنترل معنی‌دار نبود، ولی کاهش شاخص Bax در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نسبت به شاهد دیابتی معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). همچنین میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین نسبت به گروه کنترل دیابتی تغییر معنی‌داری نشان نداد. میزان مالون دی‌آلدئید در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل دیابتی نشان داد (P<۰/۰۵). سطح بافتی شاخص‌های Bax و مالون دی‌آلدئید در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین در مقایسه با گروه شاهد دیابتی به طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵).

سطح بافتی شاخص Bcl2 و آنزیم‌های کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین در مقایسه با گروه شاهد دیابتی به طور معنی داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). در مقایسه دو غلظت کروسین، نتایج نشان داد سطح بافتی شاخص Bcl2 و آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز، در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین به طور معنی‌داری بیشتر از گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین است (P<۰/۰۵). همچنین سطح بافتی شاخص Bax و مقدار مالون دی‌آلدئید در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین به طور معنی‌داری کمتر از گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین است که این امر نشان‌دهنده اثر وابسته به غلظت کروسین است (جدول شماره ۱ و ۲).

از نظر میزان قند خون نتایج نشان داد قبل از دیابتی‌شدن موش‌ها در همه گروه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در مقایسه گروه کنترل دیابتی با کنترل سالم، میانگین قند خون در روزهای ۸، ۱۶ و ۲۴ بعد از شروع تیمار دارای افزایش معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). همچنین در مقایسه گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین نسبت به شاهد دیابتی،

9. Kolmogorov-Smirnov
10. One-way ANOVA

جدول ۱. میانگین سطح Bax، Bcl2 و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت بیضه موش‌های سالم و دیابتی تحت تیمار با کروسین به تفکیک گروه

گروه	میانگین±انحراف معیار			
	سالم	شاهد دیابتی	دیابتی تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین	دیابتی تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین
Bax	۱/۴۰±۰/۰۸^{f}	۱۶/۰۱±۰/۲۹^{a}	۱۵/۲۹±۰/۴۳^{b}	۳/۶۴±۰/۲۵^{e}
Bcl2	۸/۰۷±۰/۱۶^{a}	۰/۹۵±۰/۰۵^{d}	۱/۰۵±۰/۰۵^{d}	۶/۵۰±۰/۲۸^{b}
SOD	۴۱/۳۷±۱/۴۲^{a}	۳/۲۲±۰/۰۴^{c}	۵/۲۲±۰/۳۲^{c}	۲۵/۳۹±۲/۹۵^{b}
GPX	۵۶۴/۱۲±۵/۳۷^{a}	۱۰۳/۱۱±۳/۰۹^{e}	۱۲۳/۰۱±۱۷/۲۴^{d}	۳۱۸/۷۰±۵/۹۰^{c}
CAT	۴۳۷/۵۱±۴/۰۲^{a}	۱۱۴/۳۶±۳/۷۹^{e}	۱۲۱/۲۸±۲/۴۰^{e}	۳۴۹/۵۵±۷/۰۵^{b}
MDA	۲۴/۶۶±۲/۴۳^{d}	۲۴۵/۹۴±۴/۴۲^{a}	۲۱۰/۲۳±۱۲/۳۱^{b}	۷۳/۱۶±۵/۹۴^{c}

طبق آزمون LSD میانگین‌های دارای حرف مشترک اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند (P<۰/۰۵)

Bax: ng ml-1 ،Bcl2: ng ml-1 ،SOD: ng ml-1 ،GPX: Pg ml-1 ،CAT: mIU/ml ،MDA: ng ml-1

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر کروسین با دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر Bcl2،Bax و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت بیضه موش‌های سالم و دیابتی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات پارامترهای اندازه‌گیری‌شده					
		Bax	Bcl2	SOD	GPX	CAT	MDA
مدل	۵	۲۳۳/۳۰*	۵۳/۶۹*	۱۳۳۶/۸۶*	۱۸۴۹۲۰*	۱۰۶۳۷۱*	۴۵۴۷۳/۲*
خطا	۱۸	۰/۰۸۷	۰/۰۲	۲/۷۲	۹۳	۲۲	۵۳/۱
کل	۲۳						

* و ns به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح ۰/۰۵، ۰/۰۱ و نبود اختلاف معنی‌دار است.

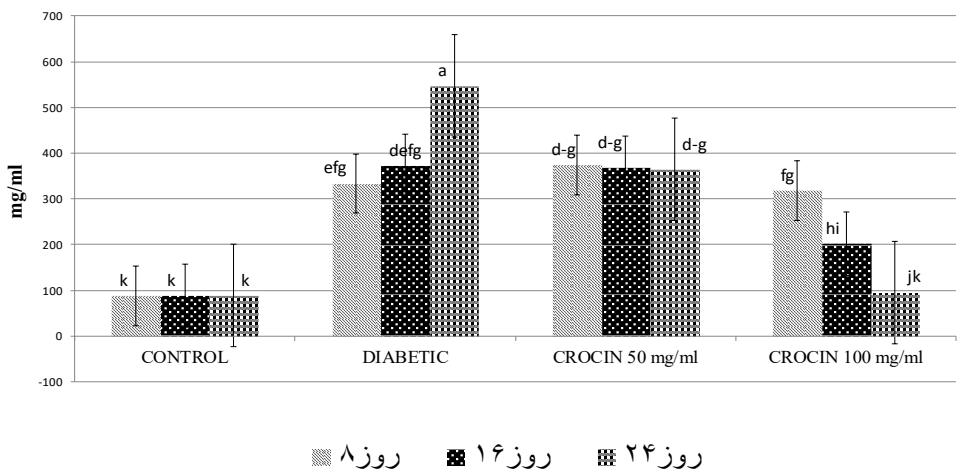
Bax: ng ml -1، Bcl2: ng ml -1، SOD: ng ml -1، GPX: Pg ml -1 ،CAT : mIU/ml، MDA: ng ml-1

در روزهای ۸ و ۱۶ اختلاف معنی‌داری بین میزان قندخون گروه‌ها مشاهده نشد، ولی در روز ۲۴ کاهش معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد از نظر میزان قند خون در مقایسه گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین نسبت به شاهد دیابتی، در روز ۸ اختلاف معنی‌دار نبود. با این حال در گروه دیابتی تحت تزریق کروسین با غلظت ۱۰۰ در روزهای ۱۶ و ۲۴ قند خون پایین‌تری نسبت به گروه کنترلد دیابتی نشان دادند (P<۰/۰۵). در روز ۱۶ و ۲۴، گروه تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین میزان قند خون پایین‌تری نسبت به گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ کروسین نشان دادند که این امر نشان‌دهنده اثر وابسته به دُز کروسین است (تصویر شماره ۱).

مطالعات انجام‌شده در رابطه با میانگین وزن موش‌های صحرایی نشان داد در روز یک شروع تیماردهی در همه گروه‌ها اختلاف معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). در مقایسه گروه کنترل دیابتی با شاهد سالم در روز ۸ تیماردهی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، ولی در روزهای ۱۶ و ۲۴ کاهش وزن موش‌ها در گروه کنترل دیابتی محسوس بود (P<۰/۰۵). در مقایسه گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین نسبت به شاهد دیابتی، در روزهای ۸ و ۱۶ اختلاف معنی‌داری در وزن موش‌ها مشاهده نشد، ولی در روز ۲۴، افزایش معنی‌داری در میانگین وزن موش‌های صحرایی تحت تیمار با کروسین ۵۰ مشاهده شد (P<۰/۰۵). در روز ۱۶ در مقایسه گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین نسبت به کنترل دیابتی، کاهش میانگین وزن موش‌ها معنی‌دار نبود، ولی در روز ۲۴ افزایش معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵). در گروه تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیترکروسین نسبت به گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ کروسین، در روز ۲۴ افزایش میانگین وزن موش‌های صحرایی معنی‌دار بود که نشان‌دهنده اثر وابسته به دُز کروسین است (تصویر شماره ۲).

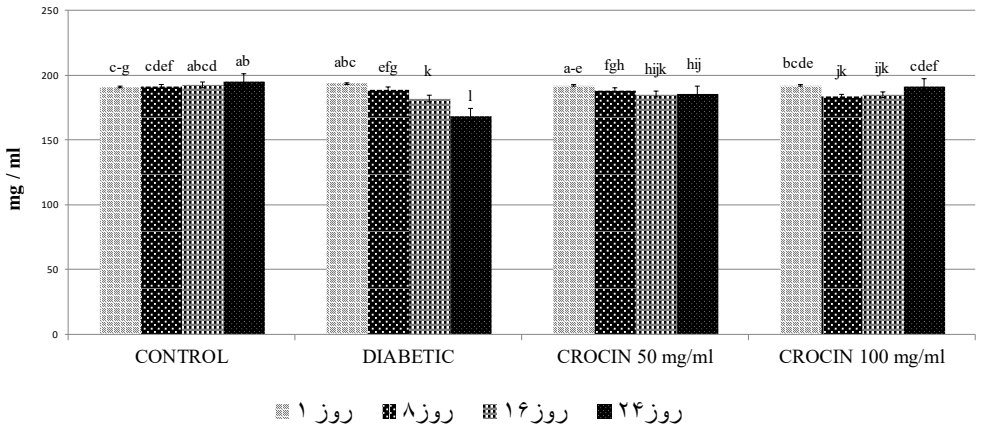
بحث

در پژوهش حاضر، اثر کروسین در بهبود پارامترهای اسپرمی در موش‌های صحرایی دیابتی بررسی شد. عوامل دخیل در افزایش استرس‌های اکسایشی در بیماران دیابتی شامل کاهش آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون



تصویر ۱. مقایسه میانگین قند موش‌های دیابتی در روزهای ۸، ۱۶ و ۲۴ بعد از شروع تیماردهی

طبق آزمون LSD حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).



تصویر ۲. مقایسه میانگین وزن موش‌های دیابتی در روزهای ۱، ۸، ۱۶ و ۲۴ بعد از شروع تیماردهی

طبق آزمون LSD حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

افق دانش

پراکسیداز است. در افراد سالم میزان مالون دی‌آلدئید کمتر از افراد دیابتی است و میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بیشتر از افراد دیابتی است [۲۵].

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده کروسین با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توانست میانگین درصد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز را نسبت به گروه کنترل دیابتی به طور معنی‌داری افزایش دهد؛ همچنین مقدار مالون دی‌آلدئید را به طور معنی‌داری کاهش داد (P<۰/۰۵). با توجه به اینکه همه موش‌های گروه آزمیش تیمارشده با کروسین و گروه کنترل دیابتی توسط استرپتوزوتوسین دیابتی شده‌اند، می‌توان بهبودی در پارامترهای کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و سطح بافتی شاخص Bcl2 در گروه آزمایش تیمارشده با کروسین را به ترکیبات مؤثر در این گیاه نسبت داد. پژوهش‌ها نشان داده است کروسین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بسیار است و موجب افزایش سطح انسولین خون و کاهش سطح قند خون نمونه‌های دیابتی می‌شود و همچنین تاکنون هیچ‌گونه اثر مخربی از کروسین بر بافت کبد و کلیه گزارش نشده است [۶].

افزایش سطح سرمی قند خون در دیابت باعث افزایش سطح رادیکال‌های آزاد و درنهایت افزایش استرس‌های اکسیداتیو سلولی می‌شود [۴]. تحقیقات دیگری نیز در زمینه بررسی کروسین و بررسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در موش‌های دیابتی انجام شده است؛ برای مثال شیرعلی و همکاران در سال ۱۳۹۱ به بررسی اثر کروسین در مقاومت انسولین و پروفایل‌های لیپیدی پرداختند و نتایج آن‌ها نشان داد کروسین دارای اثرات ضددیابتی است و موجب بهبود پروفایل لیپیدی در مبتلایان به دیابت می‌شود [۷]. در مطالعه‌ای که توسط کیانبخت و همکاران درباره اثرات ضدهیپرگلیسمی زعفران انجام شد، نشان داده شد کروسین و سافرانال در احیای سلول‌های بتا در موش‌های دیابتی‌شده با آلوکسان مؤثر است که این نتایج، تأییدکننده خواص آنتی‌اکسیدانی زعفران است [۶]. مطالعه بررسی دیابت در کانال‌های Hemomicrocircular بافت بیضه نشان داد دیابت باعث تخریب عمیق در کانال‌های Hemomicrocircular بافت بیضه و کاهش لومن مویرگی می‌شود [۲۶].

سمرقندیان و همکاران مطالعه‌ای را مشابه مطالعه حاضر در مورد اثر عصاره زعفران بر بافت ریه در موش‌های صحرایی دیابتی‌شده انجام دادند که نتایج کار نشان‌دهنده خواص آنتی‌اکسیدانی زعفران و تأثیر مثبت آن بر بهبود سطح آنزیم‌هایی مانند سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز بود [۲۷]. مطالعات صورت‌گرفته توسط حسنان و همکاران نشان می‌دهد میزان بیان پروتئین Bax در شبکیه چشم افراد دیابتی افزایش می‌یابد و موجب آپوپتوز سلول‌ها می‌شود ولی در بیماران تحت درمان، میزان بیان Bax کاهش یافته و در مقابل برای سرکوب آپوپتوز در سلول‌ها، بیان Bcl2 افزایش می‌یابد [۱۱].

ایرج جعفری انارکولی و همکاران در مطالعه‌ای دیگر نشان دادند دیابت باعث افزایش بیان پروتئین Bax و کاهش بیان Bcl2 در سطح mRNA هیپوکامپ موش‌های دیابتی می‌شود. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد استفاده از انسولین و اسیدآسکوربیک به‌تنهایی و به صورت ترکیبی می‌تواند از طریق افزایش میزان بیان ژن Bcl2 و کاهش میزان بیان ژن Bax، آپوپتوز را در هیپوکامپ موش‌های صحرایی دیابتی مهار کند [۱۷].

یافته‌های حاصل از انجام این مطالعه نیز نشان داد سطح بافتی شاخص Bax و مقدار مالون دی‌آلدئید در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم دارای افزایش معنی‌داری است. با این حال سطح بافتی شاخص Bcl2 و آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز کاهش معنی‌داری یافت. در مقایسه گروه‌های تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر

میلی‌لیتر کروسین کاهش معنی‌داری در سطح بافتی شاخص Bax و میزان مالون دی‌آلدئید در گروه تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین نسبت به گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ کروسین مشاهده شد، ولی سطح بافتی شاخص Bcl2 و آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در گروه تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین، افزایش معنی‌داری نسبت به گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کروسین نشان داد که دلیل آن اثر وابسته به غلظت کروسین است ($P<0/05$).

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان گفت افزایش معنی‌دار در سطح آنزیم‌های کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز در گروه تیمارشده با غلظت بالای کروسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در مقایسه با گروه کنترل دیابتی به معنای اثرات مثبت کروسین بر بافت بیضه موش‌های دیابتی است.

نتیجه‌گیری

کروسین با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توانست شاخص سطح بافتی Bax را کاهش و سطح بافتی Bcl2 و همچنین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز را نسبت به گروه شاهد دیابتی به طور معنیداری افزایش دهد؛ همچنین آسیب‌های القاشده توسط دیابت در بافت بیضه موش‌های صحرایی را بهبود بخشید.

از آنجا که روشن‌شدن مکانیسم عمل ترکیبات مؤثر گیاه زعفران در بهبود پارامترهای اسپرمی و بافت بیضه در نمونه‌های دیابتی نیاز به تحقیقات بیشتر دارد، پیشنهاد می‌شود بررسی‌های سیتولوژیکی بیشتری در این زمینه انجام شود. همچنین از آنجا که در این پژوهش از کروسین در انجام مطالعات استفاده شد می‌توان در مطالعات دیگر از اجزای دیگر عصاره زعفران استفاده کرد و با توجه به مشاهده اثرات مطلوب کروسین بر شاخص‌های ارزیابی‌شده و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با افزایش غلظت کروسین می‌توان گفت اثربخشی کروسین وابسته به غلظت است؛ بنابراین استفاده از غلظت‌های بالاتر کروسین جهت افزایش اثربخشی آن پیشنهاد می‌شود. از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به تأثیر عوامل مختلف فیزیولوژیکی و محیطی که بر سیستم‌های زنده حاکم است، اشاره کرد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

رعایت تمامی حقوق حیوانات آزمایشگاهی در پژوهش برای استفاده انسانی مبتنی بر دستورالعمل‌های بین‌المللی مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی بود و کد اخلاقی این طرح پژوهشی IR.NUMS.REC.1395.47 است.

حامی مالی

هزینه اجرای این پژوهش به عهده شخص دانشجو بوده است.

مشارکت نویسندگان

هرسه نویسنده در همه موارد با هم مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

References

[1] Jahromi HK, Dehghan F, Saremi J, Pourahmadi M. The effect of walnut leaf aqueous extract (Juglans regia L.) on the embryonic testicles evolutionary trend in streptozotocin-induced rats with type I diabetes. International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research. 2017; 7(5):35-40.

[2] Shahraki MR, Mirshekari H, Khamar Moghadam S. [Effect of short-time consumption of oral magnesium sulfate on blood glucose and serum lipids in streptozotocin-induced diabetic male rats (Persian)]. Quaterly of the Horizon of Medical Siences. 2013; 19(2):67-70.

[3] Saleh RA, Hcld AA. Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. Journal of Andrology. 2002; 23(6):737-52. [DOI:10.1002/j.1939-4640.2002.tb02324.x] [PMID]

[4] Rahbarian R, Sepehri Moghadam H, Sadoughi SD. [Effect of aqueous extract of Launaea acanthodes on testicular tissue and sperm parameters in alloxan-induced diabetic rats (Persian)]. Quaterly of the Horizon of Medical Siences. 2015; 21(1):21-9. [DOI:10.18869/acadpub.hms.21.1.21]

[5] Ford W. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. Human Reproduction Update. 2004; 10(5):387-99. [DOI:10.1093/humupd/dmh034] [PMID]

[6] Kianbakht S, Hajiaghaee R. Anti-hyperglycemic effects of saffron and its active constituents, crocin and safranal, in alloxan-induced diabetic rats. Journal of Medicinal Plants. 2011; 3(39):82-9.

[7] Shirali S, Bathaie SZ, Nakhjavani M. Effect of crocin on the insulin resistance and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. Phytotherapy Research. 2013; 27(7):1042-104. [DOI:10.1002/ptr.4836] [PMID]

[8] Samarghandian S, Borji A, Delkhosh MB, Samini F. Safranal treatment improves hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences. 2013; 16(2):352-62. [DOI:10.18433/J3ZS3Q]

[9] Kiasalari Z, Roghani M, Baluchnejadmojarad T, Abdolrazaghnezhad A. [Involvement of bax and Bcl2 in neuroprotective effect of curcumin in kainic acid-induced model of temporal lobe epilepsy in male rat (Persian)]. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 2016; 16(1):32-40.

[10] Yang H, Jin X, Lam CWK, Yan SK. Oxidative stress and diabetes mellitus. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2011; 49(11):1773-82. [DOI:10.1515/cclm.2011.250] [PMID]

[11] Hasnan J, Yusoff M, Damitri T, Faridah A, Adenan A, Norbaini T. Relationship between apoptotic markers (Bax and Bcl-2) and biochemical markers in type 2 diabetes mellitus. Singapore Medical Journal. 2010; 51(1):50-5. [PMID]

[12] Arikawe A, Daramola A, Odofin A, Obika L. Alloxan-induced and insulin-resistant diabetes mellitus affect semen parameters and impair spermatogenesis in male rats. African Journal of Reproductive Health. 2006; 10(3):106-13. [DOI:10.2307/30032477] [PMID]

[13] Agbaje I, Rogers D, McVicar C, McClure N, Atkinson A, Mallidis C, et al. Insulin dependant diabetes mellitus: Implications for male reproductive function. Human Reproduction. 2007; 22(7):1871-7. [DOI:10.1093/humrep/dem077] [PMID]

[14] Ricci G, Catizone A, Esposito R, Pisanti F, Vietri MT, Galdieri M. Diabetic rat testes: Morphological and functional alterations. Andrologia. 2009; 41(6):361-8. [DOI:10.1111/j.1439-0272.2009.00937.x] [PMID]

[15] Podesta F, Romeo G, Liu WH, Krajewski S, Reed JC, Gerhardinger C, et al. Bax is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. The American Journal of Pathology. 2000; 156(3):1025-32. [DOI:10.1016/S0002-9440(10)64970-X]

[16] Gurzov EN, Eizirik DL. Bcl-2 proteins in diabetes: Mitochondrial pathways of β-cell death and dysfunction. Trends in Cell Biology. 2011; 21(7):424-31. [DOI:10.1016/j.tcb.2011.03.001] [PMID]

[17] Jafari Anarkooli I, Sankian M, Ahmadpour S, Haghir H, Bonakdaran S, Varasteh A. [The study of effects of insulin and ascorbic acid on bcl-2 family expression in hippocampus of streptozotocin -induced diabetic rats (Persian)]. Journal of Advances in Medical and Biomedical Research. 2007; 15(60):1-16.

[18] Hajinejad Boshroue R, Behnam Rassouli M, Tehranipour M, Gheybi F, Hajinejad Sh, Elahi Moghaddam Z. [The effects of hydro- alcoholic extract of launaea acanthodes on the blood, urine albumin and bilirubin levels in male hyperglycemic Wistar Rat (Persian)]. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism. 2013; 15(2):190-6.

[19] Amir Ghasemi T. [Saffron red gold of Iran (Persian)]. Tehran: Ayandegan; 2001.

[20] Hosseinzadeh H, Modaghegh MH, Saffari Z. Crocus sativus L. (saffron) extract and its active constituents (crocin and safranal) on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2009; 6(3):343-50. [DOI:10.1093/ecam/nem125] [PMID] [PMCID]

[21] Kianbakht S, Mozaffari K. Effects of saffron and its active constituents, crocin and safranal, on prevention of indomethacin induced gastric ulcers in diabetic and nondiabetic rats. Journal of Medicinal Plants. 2009; 1(29):30-8.

[22] Rahbarian R, Sepehri Moghadam H, Sadoughi SD. [Effect of aqueous extract of Launaea acanthodes on open skin wound in diabetic rats (Persian)]. Quarterly of the Horizon of Medical Sciences. 2016; 22(1):1-11. [DOI:10.18869/acadpub.hms.22.1.1]

[23] Rami M, Habibi A, Khajehlandi M. [Effect of 6-weeks of endurance training on the activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes in the hippocampus of experimental diabetic male Wistar rats (Persian)]. Journal of Shaeed Sdoughi University of Medical Sciences. 2018; 26(6):483-94.

[24] Karimi MN, Abbasalipourkabir R, Arab Sadeghabadi Z, Ziamajidi N. [The level of gene expression of Bax and Bcl-2 and the activity of caspase 3 in the liver tissues of normal, type 1 and type 2 diabetic rats before and after treatment with aqueous extract of garlic (Persian)]. Journal of Shaeed Sadoughi University of Medical Sciences. 2017; 25(7):547-55.

[25] Ghojagh D, Deylam Katoli H, Habibi Nodeh M. [Level of glutathione peroxidase activity and carbonyl and malondialdelhyde levels in erythrocyte of diabetic rats (Persian)]. Quaterly of the Horizon of Medical Siences. 2013; 19(3):179-83.

[26] Kryvko Y, Mateshuk-Vatseba L, Savka I, Łuszczewska-Sierakowska I, Wawrzyniak A, Radzikowska E, et al. Ultrastructural haemomicrocircular channel links of rat testicle in streptozotocin-induced diabetes. Journal of Pre-Clinical and Clinical Research. 2014; 8(2):86-89. [DOI:10.26444/jpccr/71474]

[27] Samarghandian S, Afshari R, Sadati A. Evaluation of lung and bronchoalveolar lavage fluid oxidative stress indices for assessing the preventing effects of safranal on respiratory distress in diabetic rats. The Scientific World Journal. 2014; 2014:1-6. [DOI:10.1155/2014/251378] [PMID] [PMCID]

This Page Intentionally Left Blank