BIRJAND UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES
Journal of Translational Medical Research
https://journal.bums.ac.ir

Original Article

Study of the protective effects of hydroalcoholic extract of *Nigella sativa* on fertility parameters in type 1 diabetic syrian mice

Hooman Mohammadbeygi[1], **Mohammadreza Hosseinchi**[2]*

[1] Graduate of Doctor of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ur.C., Islamic Azad University, Urmia, Iran
[2] Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Ur.C., Islamic Azad University, Urmia, Iran

***Corresponding author:** Mohammadreza Hosseinchi
Tel: +989013318690 Fax:+984431803000 E-mail: hosseinchi.m@iau.ac.ir

ABSTRACT

Background and Objective: Type 1 diabetes negatively affects the reproductive system by inducing metabolic disturbances and increasing oxidative stress, which reduces the success of assisted reproductive techniques, such as in vitro fertilization (IVF). *Nigella sativa*, due to its bioactive compounds, such as thymoquinone and its antioxidant and anti-inflammatory properties, may be effective in reducing these disorders. This study was designed to investigate the effects of the hydroalcoholic extract of *Nigella sativa* on IVF-related fertility parameters in male diabetic mice.

Materials and Methods: Diabetes was induced in male mice by streptozotocin injection, and the animals were divided into five groups: healthy control, diabetic control, and three diabetic groups receiving *Nigella sativa* extract at doses of 50, 100, and 200 mg/kg for 30 days. Subsequently, oocytes from healthy female mice were fertilized in vitro with epididymal sperm from the male mice, and the fertilization rate, two-cell and four-cell embryo development, total antioxidant capacity, serum testosterone levels, and percentages of immature and abnormal sperm were evaluated.

Results: Diabetes significantly reduced the fertilization rate, two-cell and four-cell embryo development, total antioxidant capacity, and testosterone levels. In contrast, the percentages of immature and abnormal sperm were significantly higher. Administration of *Nigella sativa* to diabetic male mice improved their fertility parameters. In diabetic control mice, treatment with *Nigella sativa* at doses of 50 and 100 mg/kg resulted in moderate improvements in fertilized oocytes and two-cell and four-cell embryos ($P<0.05$). In contrast, the 200 mg/kg dose nearly restored these parameters to the levels observed in healthy controls ($P<0.01$). Total antioxidant capacity and serum testosterone levels increased in a dose-dependent manner ($P<0.01$). Additionally, the percentages of immature and abnormal sperm gradually decreased with higher doses ($P<0.01$).

Conclusion: Hydroalcoholic extract of *Nigella sativa* significantly reduces the adverse effects of diabetes on fertility and early embryonic development, probably because of its antioxidant and anti-inflammatory properties.

Keywords: Diabetes, Fertility, In vitro Fertilization, *Nigella Sativa*, Oxidative Stress

Citation: Mohammadbeygi H, Hosseinchi M. [Study of the protective effects of hydroalcoholic extract of *Nigella sativa* on fertility parameters in type 1 diabetic syrian mice]. Journal of Translational Medical Research. 2025; 32(3): 227-240. [Persian]

DOI http://doi.org/10.61186/JBUMS.32.3.223

Received: July 22, 2025 **Accepted:** November 10, 2025

Copyright © 2025, Journal of Translational Medical Research. This open-access article is available under the Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 (CC BY-NC 4.0) International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), which allows for the copying and redistribution of the material only for noncommercial purposes, provided that the original work is properly cited.

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.223]

مقاله اصیل پژوهشی

مطالعه اثرات محافظتی عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه بر شاخص‌های باروری در موش‌های سوری دیابتی نوع یک

هومن محمدبیگی[۱]، محمدرضا حسینچی[۲]*

چکیده

زمینه و هدف: دیابت نوع یک با ایجاد اختلالات متابولیکی و افزایش استرس اکسیداتیو، بر سیستم تولیدمثل تأثیر منفی گذاشته و موفقیت روش‌های کمک باروری مانند لقاح برون‌تنی را کاهش می‌دهد. سیاه‌دانه، به‌دلیل ترکیبات فعالی مانند تیموکینون و خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی، ممکن است در درمان این اختلالات مؤثر باشد. این مطالعه با هدف بررسی اثر عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه بر شاخص‌های باروری برون‌تنی در موش‌های نر دیابتی نوع یک طراحی و اجرا شد.

روش تحقیق: دیابت در موش‌های نر با تزریق استرپتوزوتوسین القا شد و حیوانات به پنج گروه تقسیم شدند: کنترل سالم، کنترل دیابتی و سه گروه دیابتی که به مدت ۳۰ روز دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره سیاه‌دانه دریافت کردند. سپس اووسیت‌های موش‌های ماده سالم با اسپرم‌های اپیدیدیمی موش‌های نر لقاح داده شدند و درصد لقاح، جنین‌های دو و چهار سلولی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، سطح تستوسترون و درصد اسپرم‌های نابالغ و ناهنجار اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: دیابت، درصد لقاح، جنین‌های دو سلولی و چهار سلولی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و میزان تستوسترون را کاهش داد. همین‌طور، درصد اسپرم‌های نابالغ و ناهنجار، به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. تزریق عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه به موش‌های نر دیابتی موجب بهبود شاخص‌های باروری شد. در گروه کنترل‌های دیابتی، درصد اووسیت‌های لقاح‌یافته و جنین‌های دو و چهار سلولی در درمان با عصاره سیاه‌دانه در دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به بهبود متوسط منجر شد ($P<0/05$). ولی دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم شاخص‌ها را تقریباً به سطح گروه کنترل سالم بازگرداند ($P<0/01$). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و سطح سرمی تستوسترون نیز با افزایش دوز بیشتر شد ($P<0/01$). علاوه بر این، درصد اسپرم‌های نابالغ و ناهنجار در تمامی دوزها، با افزایش دوز کاهش بیشتری داشت ($P<0/01$).

نتیجه‌گیری: عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه، احتمالاً به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی، اثرات منفی دیابت نوع یک بر باروری و رشد اولیه جنین را به‌طور چشمگیری کاهش داد.

واژه‌های کلیدی: دیابت، باروری، لقاح آزمایشگاهی، سیاه‌دانه، استرس اکسیداتیو

مجله "تحقیقات پزشکی ترجمانی". ۱۴۰۴؛ ۳۲ (۳): ۲۴۰-۲۲۷.

دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۳۱ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۱۹

[۱] فارغ التحصیل دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

[۲] گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

*نویسنده مسئول: محمدرضا حسینچی

آدرس: آذربایجان غربی- ارومیه- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه- دانشکده دامپزشکی- گروه علوم پایه

تلفن: ۰۹۰۱۳۳۱۸۶۹۰ نمابر: ۰۴۴۳۱۸۰۳۰۰۰ پست الکترونیکی: hosseinchi.m@iau.ac.ir

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.223]

مقدمه

دیابت ملیتوس، یک اختلال متابولیک مزمن و رو به گسترش جهانی است که مشخصه آن هیپرگلیسمی است. این وضعیت از نقص در ترشح یا عملکرد انسولین، یا هر دو ناشی می‌شود (۱). دیابت نوع یک (T1DM) که ۵ تا ۱۰ درصد موارد دیابت را تشکیل می‌دهد و غالباً در کودکی و نوجوانی تشخیص داده می‌شود، به دلیل تخریب اتوایمیون سلول‌های بتای پانکراس و کمبود مطلق انسولین اتفاق می‌افتد (۲). این بیماری علاوه بر عوارض شناخته‌شده‌ای مانند بیماری‌های قلبی-عروقی، نفروپاتی، نوروپاتی و رتینوپاتی، می‌تواند تأثیرات نامطلوبی بر عملکرد سیستم تولیدمثلی، به‌ویژه در مردان، داشته باشد (۳).

در مردان دیابتی، اختلالات متعددی در عملکرد تولیدمثلی گزارش شده که می‌تواند منجر به ناباروری شود. این مشکلات شامل کاهش حجم مایع منی، کاهش تعداد و تحرک اسپرم، افزایش مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم و آسیب به یکپارچگی DNA اسپرم است. همچنین، دیابت با ایجاد نوروپاتی اتونومیک می‌تواند باعث اختلالات نعوظ و انزال شود (۳). این عوامل نه تنها شانس باروری طبیعی را کاهش می‌دهند، بلکه بر نتایج روش‌های کمک باروری [1] مانند لقاح آزمایشگاهی نیز تأثیر منفی می‌گذارند. هیپرگلیسمی مزمن و استرس اکسیداتیو ناشی از آن، نقش کلیدی در پاتوژنز اختلالات باروری مردان دیابتی ایفا می‌کنند (۴). افزایش گونه‌های فعال اکسیژن [2] و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن، می‌تواند به اسپرم‌ها آسیب رسانده و عملکرد آن‌ها را مختل کند، سطح تستوسترون را کاهش دهد و در نهایت پتانسیل لقاح و تکامل جنینی پس از لقاح را کاهش دهد. کیفیت پایین گامت پدری به دلیل دیابت، می‌تواند بر تقسیمات اولیه جنین و کیفیت آن تأثیرگذار باشد (۵).

در سال‌های اخیر، توجه به ترکیبات طبیعی با خواص درمانی برای مدیریت عوارض دیابت و بهبود شاخص‌های باروری افزایش یافته است. سیاه‌دانه (*Nigella sativa L*)، از خانواده آلالگان (Ranunculaceae)، یکی از این گیاهان دارویی مهم است که در طب سنتی خاورمیانه، شمال آفریقا و آسیا برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله دیابت، التهاب و ناباروری استفاده می‌شود (۶). دانه‌های سیاه‌دانه حاوی ترکیبات فعال بیولوژیکی متعددی از جمله تیموکینون(TQ)، روغن‌های ثابت (مانند لینولئیک و اولئیک اسید) و آلکالوئیدها هستند (۷). تیموکینون به عنوان اصلی‌ترین ترکیب فعال شناخته شده و مطالعات فارماکولوژیک متعددی خواص آنتی‌اکسیدانی قوی، ضد التهابی، ضد دیابتی و محافظت‌کننده سلولی را برای آن اثبات کرده‌اند (۸، ۷).

شواهد علمی نشان می‌دهد که سیاه‌دانه و ترکیبات فعال آن می‌توانند از طریق مکانیسم‌های مختلفی به بهبود پارامترهای مرتبط با دیابت و باروری در مردان کمک کنند. مطالعات بسیاری اثرات ضددیابتی سیاه‌دانه را در مدل‌های حیوانی و انسانی، از جمله کاهش سطح گلوکز خون و بهبود حساسیت به انسولین، نشان داده‌اند (۷). این ترکیبات با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن از طریق تقویت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اندوژن و کاهش نشانگرهای التهابی، می‌توانند از اسپرم‌ها و سلول‌های زایای بیضه در برابر آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو و التهاب مزمن محافظت کنند (۸). همچنین، گزارش‌هایی مبنی بر اثرات مثبت سیاه‌دانه بر بهبود پارامترهای اسپرم (تعداد، تحرک، مورفولوژی)، افزایش سطح تستوسترون و عملکرد بیضه‌ها در مدل‌های حیوانی نر وجود دارد (۹).

با توجه به اثرات مخرب دیابت بر عملکرد تولید مثلی مردان و پتانسیل درمانی قابل توجه سیاه‌دانه، بررسی تأثیر این گیاه بر نتایج IVF با استفاده از گامت‌های پدری تحت تأثیر دیابت، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی اثرات محافظتی تجویز دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه بر شاخص‌های باروری برون‌تنی (متأثر از کیفیت اسپرم) شامل درصد لقاح، درصد جنین‌های دو سلولی و درصد جنین‌های چهار سلولی و همین‌طور ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، سطح تستوسترون و درصد اسپرم‌های نابالغ و ناهنجار در موش‌های سوری نر دیابتی نوع یک بود.

[1] Assisted Reproductive Technologies
[2] Reactive Oxygen Species

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.223]

روش تحقیق

روش تهیه عصاره

دانه‌های سیاه‌دانه از عطاری دارای مجوز از وزارت بهداشت تهیه و پس از تأیید توسط متخصصین گیاه‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه با شماره هرباریوم ۴۲۱۸، توسط آسیاب برقی پودر شد. ۴۰۰ گرم از پودر در یک بشر حاوی یک لیتر اتانول ۸۰ درجه ریخته و یک هفته به حال خود رها گردید. بعد از یک هفته محلول فیلتر و توسط روتاری با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۶۰ دور در دقیقه به‌صورت یک محصول مایع نیمه‌جامد استخراج شد. محصول به‌دست آمده دو روز در زیر هود و داخل پلیت قرار گرفت تا عصاره کاملاً غلیظ شود. عصاره کاملاً غلیظ شده در فریزر منفی ۲۰ درجه نگهداری شد (۱۰).

روش اجرایی آزمایش

در این مطالعه، ۲۵ موش سوری نژاد NMRI نر با میانگین وزن ۲±۲۶ گرم و سن ۸ هفته از مرکز آزمایشگاهی حیوانات دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه خریداری و در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد با پلت مخصوص موش[1] تغذیه گردید. آب نیز به صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار گرفت. پس از یک هفته سازگاری با محیط، حیوانات به‌طور تصادفی به ۵ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه‌های تجربی عصاره سیاه‌دانه را به مدت ۳۰ روز، در دوزهای کم، متوسط و بالا (۵۰–۱۰۰–۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم داخل صفاقی) دریافت کردند.

گروه اول، گروه شاهد بود که سرم فیزیولوژیک دریافت می‌کرد. گروه دوم، شامل موش‌های مبتلا به دیابتی بود که سرم فیزیولوژیک دریافت می‌کردند. گروه سوم، چهارم و پنجم موش‌های مبتلا به دیابتی بودند که تحت درمان با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه بودند (۱۱).

برای القای دیابت در موش‌ها، از داروی استرپتوزوتوسین[2] به میزان ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به‌صورت تک دوز و داخل صفاقی حل‌شده در بافر سیترات (pH=۴/۵). استفاده شد. برای تأیید دیابتی شدن موش‌ها میزان گلوکز خون با گلوکومتر اندازه‌گیری شد. موش‌هایی که قند خون آن‌ها بالاتر از ۳۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود، به‌عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند (۱۲). در روز سی‌ام آزمایش، موش‌های سوری گروه‌های تیمار و کنترل با تزریق داخل صفاقی کتامین ۵ درصد (۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین ۲ درصد (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش و در نهایت با کلرفرم آسان‌کشی شدند (۱۳). خون از قلب، با استفاده از سرنگ‌های استریل جمع‌آوری شد. نمونه‌های خون در لوله‌های بدون ضدانعقاد ریخته شدند و پس از ۳۰ دقیقه انجماد، برای جداسازی سرم در دمای محیط به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سرم‌های به‌دست‌آمده در دمای ۲۰– درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمون‌ها نگهداری شدند (۱۰).

جمع‌آوری و آماده‌سازی اسپرم

دم اپیدیدیم‌های هر موش نر در شرایط استریل جدا و در محیط کشت HTF حاوی ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی (BSA) قرار داده شدند. با ایجاد برش‌هایی در اپیدیدیم، اسپرم‌ها به داخل محیط راه یافته و پس از ۶۰–۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر ۵٪ CO2 جهت ظرفیت‌یابی، برای IVF استفاده شدند (۱۴).

تخمک‌گیری و لقاح آزمایشگاهی (IVF)

۱۰ رأس موش ماده چهار هفته‌ای نژاد NMRI از مرکز آزمایشگاهی حیوانات دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه خریداری و پس از یک هفته تطابق با محیط، برای القای سوپر اوولاسیون آماده‌سازی شدند. این فرآیند شامل تزریق داخل صفاقی ۷/۵ واحد بین‌المللی گنادوتروپین سرم مادیان باردار (PMSG، Folligon، هلند) بود. ۲۴ ساعت پس از آن، تزریق داخل صفاقی ۷/۵ واحد بین‌المللی گنادوتروپین جفتی انسانی (hCG، Folligon، Intervet) انجام شد. ۱۳ ساعت پس از تزریق hCG، موش‌های ماده آسان‌کشی شدند و اووسیت‌های بالغ، از مجاری تخمک‌بر خارج

[1] Mouse pellet
[2] Streptozotocin

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.223]

و به محیط HTF منتقل گردیدند. با عمل پیپتینگ، توده کومولوسی همراه اووسیت ها پراکنده و جدا شد.

برای انجام لقاح، ۱۵ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم ظرفیت‌یابی شده (با غلظت ۱×۶^{۱۰} اسپرم متحرک در میلی‌لیتر) به قطرات محیط لقاح حاوی اووسیت‌ها اضافه شد. دیش‌های لقاح در انکوباتور CO_2 ۳۷ درجه سانتی‌گراد، (CO_2 ۵%)به مدت ۶ ساعت انکوبه شدند. میزان لقاح با مشاهده پیش‌هسته‌های نر و ماده (pronuclei) با میکروسکوپ اینورت بررسی شد. ۲۴ ساعت پس از لقاح، درصد جنین‌های دو سلولی و ۴۰ ساعت بعد، درصد جنین‌های چهار سلولی شمارش و ثبت شد (۱۵).

آماده‌سازی محیط کشت برای IVF

برای آماده‌سازی محیط کشت، عصر روز قبل از لقاح، محیط‌های کشت مورد نیاز مانندHTF، در انکوباتور CO_2 ۳۷درجه سانتی‌گراد، (CO_2 ۵%) قرار داده شدند تا به تعادل برسند. محیط لقاح به صورت قطرات ۵۰۰ میکرولیتری و محیط شستشو به صورت ۸-۱۰ قطره ۱۵۰ میکرولیتری در دیش‌های پتری آماده شدند. تمامی این قطرات بلافاصله با لایه‌ای از روغن معدنی پوشانده شدند تا از تبخیر و تغییر pH محیط جلوگیری شود. در روز لقاح، اووسیت‌ها و سوسپانسیون اسپرم به محیط کشت منتقل گردیدند. پس از مشاهده پرونوکلئوس‌ها، تخمک‌های لقاح‌یافته شستشو داده شده و به محیط تازه برای ادامه رشد جنین منتقل شدند (۱۶).

نحوه محاسبه

حدود ۶ ساعت پس از لقاح، اووسیت‌ها تحت میکروسکوپ اینورت بررسی شدند و اووسیت‌هایی که دارای دو پیش‌هسته (2PN) و دو جسم قطبی بودند، به‌عنوان تخمک‌های بارور در نظر گرفته شدند. سپس درصد باروری با تقسیم تعداد اووسیت‌های دارای ۲PN بر تعداد کل اووسیت‌های بالغ تلقیح‌شده (MII) و ضرب در صد محاسبه گردید.

نرخ تشکیل جنین‌های دو سلولی (2-cell rate) و چهار سلولی (4-cell rate) نیز به روش Gardner وLane، و Abe و همکاران تعیین شد (۲۲،۲۴). برای این منظور، جنین‌ها به‌ترتیب در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۰ ساعت پس از لقاح، در محیط کشت بررسی شدند و تعداد جنین‌های دارای دو یا چهار بلاستومر شمارش گردید (۱۷). سپس درصد هر مرحله با تقسیم تعداد جنین‌های دو یا چهار سلولی بر تعداد کل اووسیت‌های بالغ لقاح‌یافته و ضرب در صد، محاسبه شد.

به‌صورت خلاصه روابط زیر برای محاسبه شاخص‌ها به‌کار رفت:

درصد نرخ باروری برابر است با تعداد PN۲ تقسیم بر تعداد کل اووسیت‌های MII تلقیح‌شده ضربدر ۱۰۰

درصد نرخ ۲-cell برابر است با تعداد جنین‌های دو سلولی تقسیم بر تعداد کل اووسیت‌های MII تلقیح‌شده ضربدر ۱۰۰

درصد نرخ ۴-cell برابر است با تعداد جنین‌های چهار سلولی تقسیم بر تعداد کل اووسیت‌های MII تلقیح‌شده ضربدر ۱۰۰

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC)[1]

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه سرم‌ها، با استفاده از روش FRAP[2] تعیین شد. ابتدا معرف FRAP با مخلوط کردن ۱۰ میلی‌لیتر بافر استات ۰/۳ مولار(pH=3.6) ، ۱ میلی‌لیتر محلول TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-s-triazine) ۱۰ میلی‌مولار در ۴۰HCl میلی‌مولار و ۱ میلی‌لیتر محلول $FeCl_3$ ۲۰ میلی‌مولار تهیه گردید. معرف به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد پیش‌گرم شد.

برای انجام آزمایش، ۲۰۰ میکرولیتر معرف FRAP به ۳۰ میکرولیتر نمونه سرم اضافه شد و مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج ۵۹۳ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (Spectronic 20D، Milton roy ، امریکا) خوانده شد. مقادیر TAC با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده از تروکس (Trolox) به صورت میکرومول معادل تروکس در لیتر یا گرم نمونه بیان گردید (۲۶).

[1] Total Antioxidant Capacity
[2] Ferric Reducing Ability of Plasma

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.223]

بررسی سطح تستوسترون

سطح تستوسترون سرم با استفاده از کیت‌های ایمونواسی رقابتی بر پایه آنزیم الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Competitive ELISA) تعیین گردید. (ایده آل تشخیص آتیه، ایران) نمونه‌های خون جمع‌آوری شده از موش‌ها پس از جداسازی ۵۰-۱۰۰ میکرولیتر سرم با سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مراحل اندازه‌گیری طبق پروتکل کیت، شامل افزودن سرم به چاهک‌های پوشیده شده با ۱۰۰ میکرولیتر محلول آنتی‌بادی خاص تستوسترون، انکوباسیون نمونه‌ها به مدت ۳۰-۶۰ دقیقه در دمای اتاق، شستشو به‌منظور حذف مواد غیرمتصل، افزودن ۵۰ میکرولیتر سوبسترا و اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر بود. مقادیر جذب نوری با منحنی استاندارد ساخته شده از نمونه‌های با غلظت معلوم تستوسترون مقایسه و غلظت نهایی هورمون در نمونه‌ها گزارش شد. این اندازه‌گیری نشان‌دهنده فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد و عملکرد سلول‌های لیدیگ در تولید تستوسترون بود (۲۷).

بررسی بلوغ اسپرم

مبنای این تکنیک بر تغییرات ساختاری کروماتین طی مرحله اسپرمیوژنز است؛ بدین صورت که در طی روند بلوغ هسته، پروتئین‌های پروتامین به‌تدریج جایگزین هیستون‌ها می‌شوند و این فرایند، تراکم کروماتین و پایداری ماده ژنتیکی اسپرم را تکمیل می‌کند. از آنجایی که آنیلین بلو یک رنگ اسیدی با تمایل بالا به هیستون‌هاست، اسپرم‌های نابالغ که هنوز حاوی مقدار قابل‌توجهی هیستون هستند، به رنگ آبی تیره متمایل به خاکستری مشاهده می‌شوند؛ درحالی‌که اسپرم‌های بالغ که جایگزینی هیستون با پروتامین در آن‌ها کامل شده است، رنگ‌پذیری بسیار کمتری دارند.

برای انجام این آزمون، نمونه‌های اسپرم استخراج‌شده از موش سوری روی لام شیشه‌ای منتقل شدند و به‌مدت کوتاهی در محلول اتانول–استون (۳:۱) برای تثبیت قرار گرفتند و در هوای آزاد خشک شدند. سپس لام‌ها به‌مدت ۷ دقیقه در محلول آنیلین بلو قرار داده شدند و پس از خشک شدن مجدد در مجاورت هوا، با میکروسکوپ نوری در بزرگنمایی ×۱۰۰۰ (عدسی چشمی ×۱۰ و عدسی شیئی ×۱۰۰) مورد مشاهده و ارزیابی قرار گرفتند (۲۸).

بررسی مورفولوژی اسپرم

نمونه‌های اسپرم پس از استخراج از اپیدیدیم موش‌های نر سوری، با استفاده از بافر PBS رقیق شدند. سپس مقدار مشخصی از نمونه رقیق‌شده روی لام تمیز قرار گرفت و با رنگ‌آمیزی Eosin-Nigrosin رنگ‌آمیزی گردید. پس از خشک شدن رنگ، نمونه‌ها زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. در هر نمونه، حداقل ۲۰۰ اسپرم به صورت تصادفی شمارش شده و مورفولوژی آن‌ها بررسی گردید. درصد اسپرم‌های دارای ناهنجاری‌های ساختاری از جمله مشکلات سر (مانند سر بزرگ، سر کوچک، سر دوکی شکل)، گردن، دم خمیده یا شکسته محاسبه شد. جهت افزایش دقت، شمارش‌ها در چند میدان دید انجام و میانگین نتایج گزارش شد (۲۹).

روش‌ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها

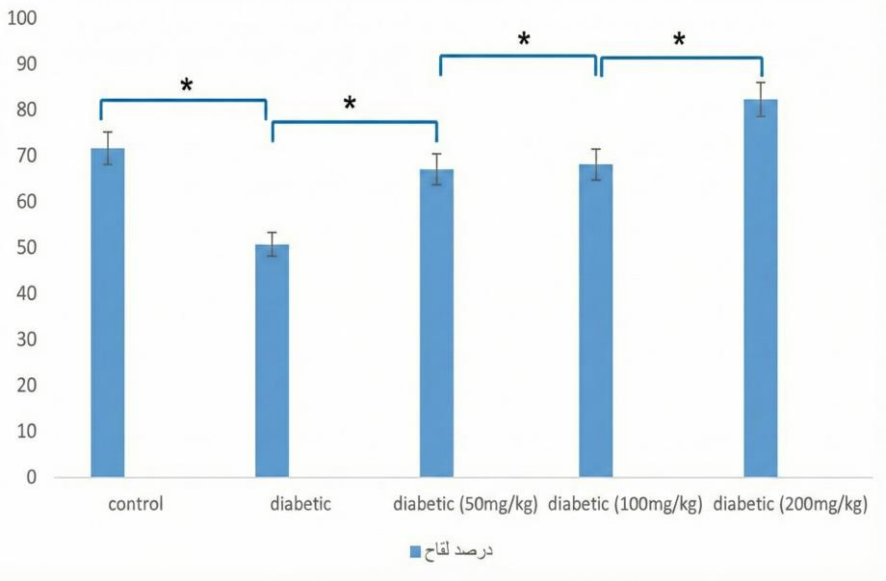
داده‌های حاصله با نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۱) مورد ارزیابی و نتایج به‌صورت میانگین±انحراف معیار بیان شد. مقایسه بین گروه‌ها با آنالیز واریانس یک طرفه و سپس تست تعقیبی توکی انجام شد. در همه موارد مقادیر $P<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر تجویز دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه بر درصد اووسیت‌های لقاح یافته (نرخ باروری)

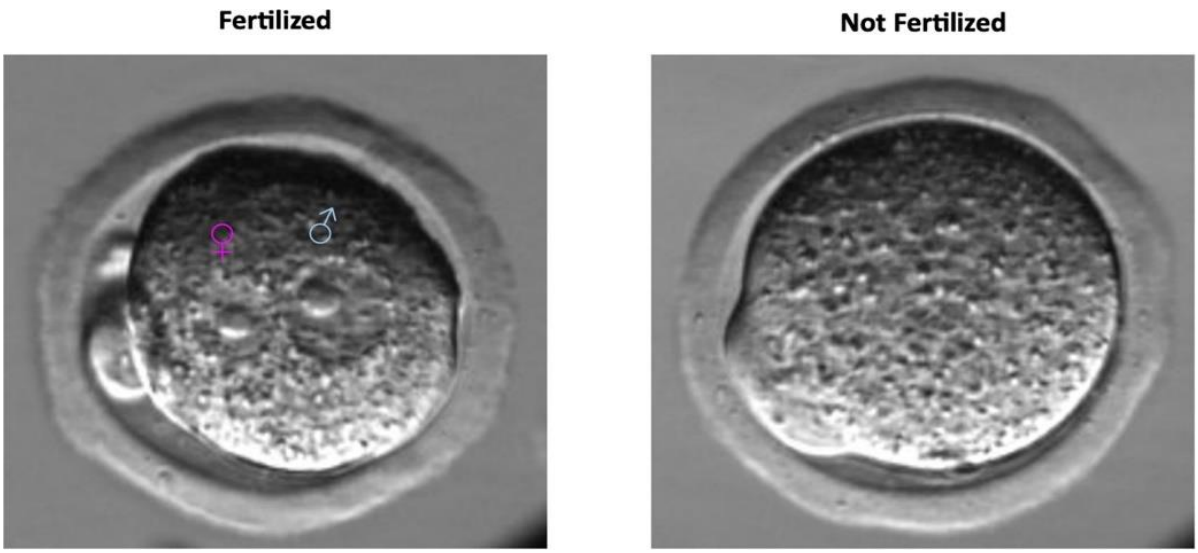
در گروه کنترل سالم، درصد اووسیت‌های لقاح‌یافته بالاتر بود، در حالی که القای دیابت نوع یک با استرپتوزوتوسین این درصد را به‌طور معنی‌داری کاهش داد ($P<0/01$).تجویز عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه اثرات محافظتی قابل توجهی داشت؛ دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم افزایش معنی‌دار ($P<0/05$) و دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم افزایش قابل توجه ($P<0/01$) ایجاد کردند، به‌طوری که درصد لقاح تقریباً به سطح گروه کنترل سالم بازگشت (نمودار۱)(تصویر۱).

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.223]



نمودار ۱- درصد لقاح (Fertility) در گروه‌های کنترل، دیابتی و تیمار عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه به روش تزریق داخل صفاقی را نشان می‌دهد (Mean±SEM) (P<۰/۰۵).

علامت * نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری (P<۰/۰۵) بین گروه‌های مشخص شده است.

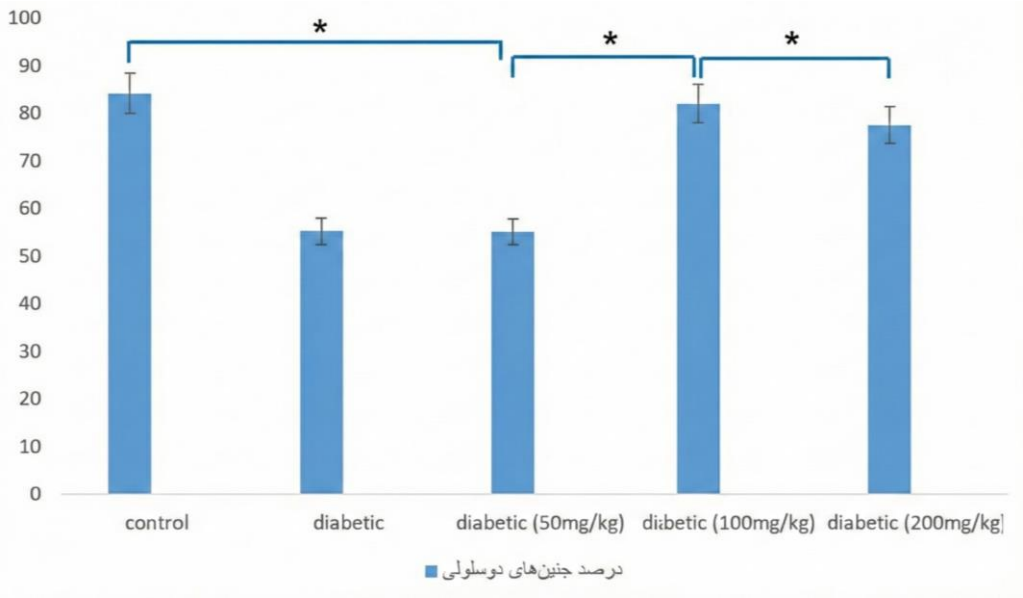


تصویر ۱- در این تصویر، اووسیت‌های لقاح یافته و اووسیت‌های لقاح نیافته در گروه کنترل دیده می‌شود.

اثر تجویز دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه بر درصد جنین‌های دو سلولی

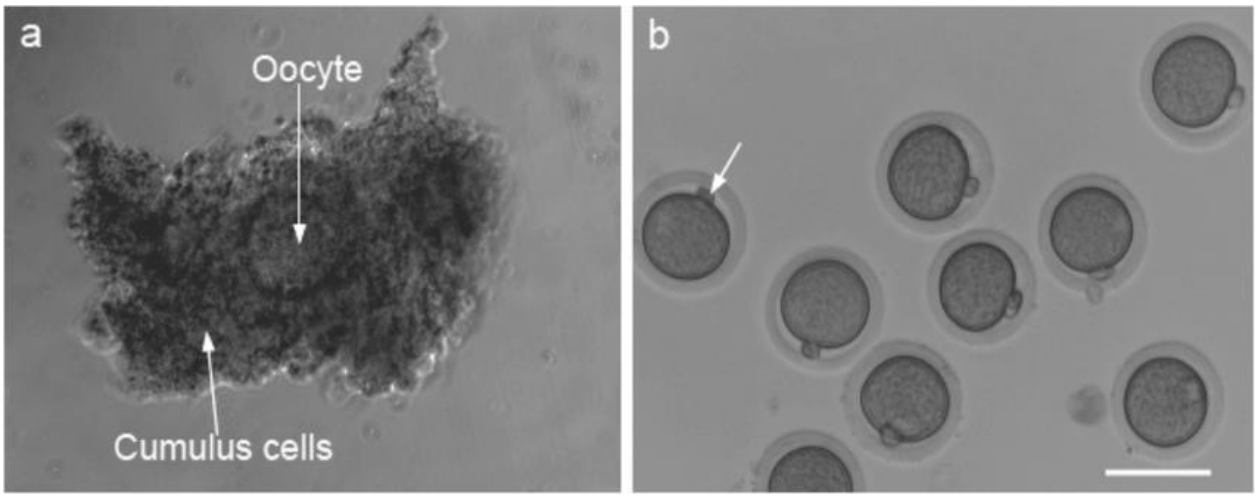
در گروه کنترل دیابتی، درصد جنین‌های دو سلولی به طور قابل توجهی کاهش یافته بود در مقایسه با گروه کنترل سالم. تجویز عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه موجب افزایش درصد جنین‌های دو سلولی در موش‌های نر دیابتی شد، به‌طوری که دوزهای ۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم اثر افزایش معنی‌دار نشان دادند (P<۰/۰۵) و دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم افزایش آن به‌طور معنادار مشاهده شد (P<۰/۰۵) (نمودار ۲)(تصویر ۲).

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.223]



نمودار ۲- درصد جنین‌های دو سلولی (Two Cell) در گروه‌های کنترل، دیابتی و تیمار عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه به روش تزریق داخل صفاقی را نشان می‌دهد (Mean±SEM) (P<۰/۰۵).

علامت * نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری (P<۰/۰۵) بین گروه‌های مشخص شده است.



تصویر ۲- در این تصویر، اووسیت‌های همراه با توده کومولوسی به‌دست آمده از آمپول رحمی موش‌های ماده مشاهده می‌شود.

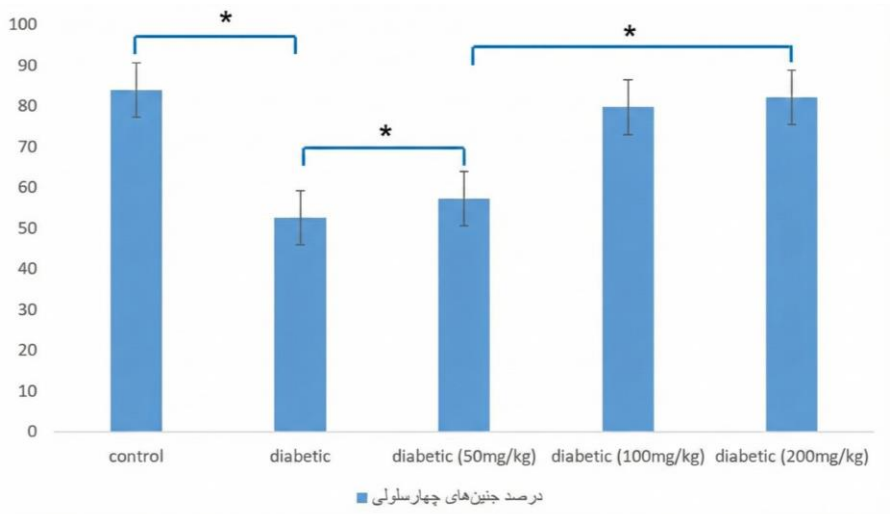
اثر تجویز دوزهای مختلف عصاره هیدرالکلی سیاه‌دانه بر درصد جنین‌های چهار سلولی

در گروه کنترل دیابتی، درصد جنین‌های چهار سلولی کاهش قابل توجهی نشان داد. تجویز عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه منجر به افزایش این درصد در موش‌های نر دیابتی شد؛ دوزهای ۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) و دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم افزایش قابل توجه (P<۰/۰۵) ایجاد کردند (نمودار۳).

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.223]

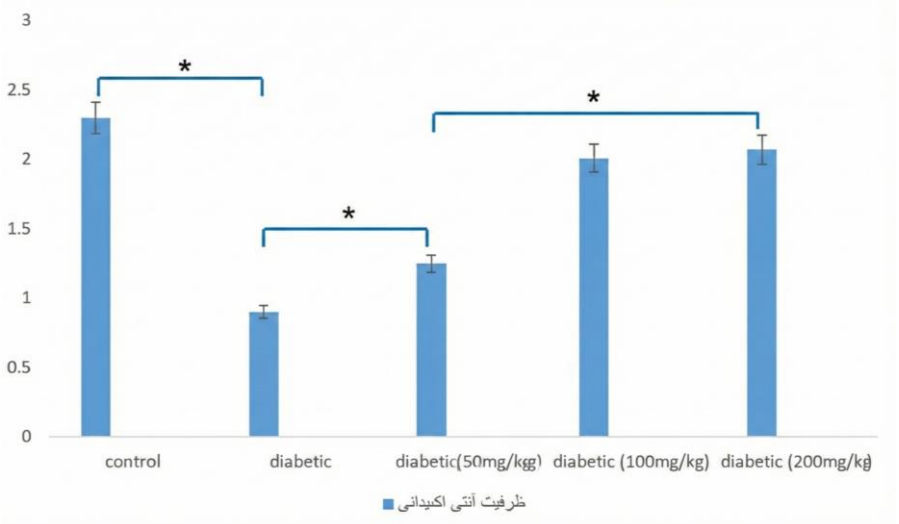
اثر تجویز دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC)

در گروه دیابتی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به‌طور قابل توجهی کاهش یافته بود. درمان با عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه موجب افزایش معنی‌دار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شد؛ دوزهای ۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم اثر افزایش قابل توجه (P<۰/۰۱) و دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم افزایش معنادار (P<۰/۰۵) نشان دادند (نمودار ۴).



نمودار ۳- درصد جنین‌های چهار سلولی (Four Cell) در گروه‌های کنترل، دیابتی و تیمار عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه به روش تزریق داخل صفاقی را نشان می‌دهد (Mean±SEM) (P<۰/۰۵).

علامت * نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری (P<۰/۰۵) بین گروه‌های مشخص شده است.



نمودار ٤- میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گروه های کنترل، دیابتی و تیمار عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه به روش تزریق داخل صفاقی (Mean±SE) (P<۰/۰۵).

علامت * نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری (P<۰/۰۵) بین گروه‌های مشخص شده است.

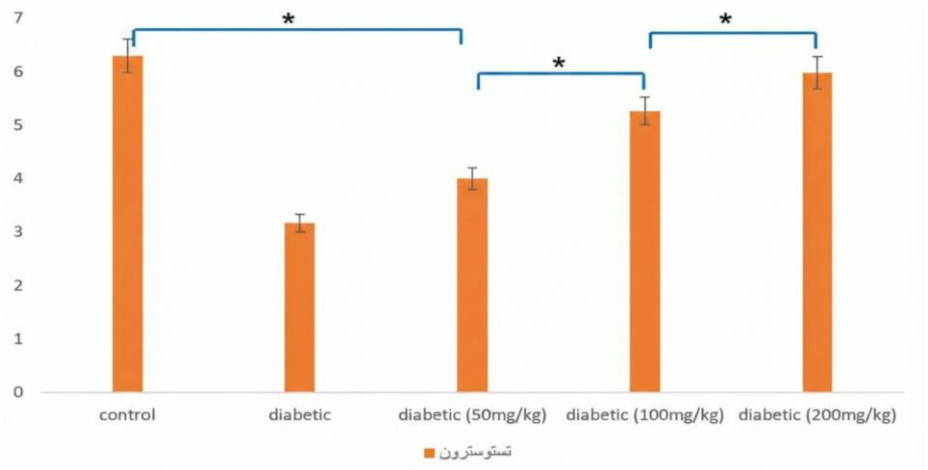
[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.223]

اثر تجویز دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه بر سطح تستوسترون

سطح سرمی تستوسترون در گروه دیابتی به‌طور قابل توجهی کاهش یافته بود. درمان با عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه موجب افزایش معنی‌دار تستوسترون شد؛ دوزهای ۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم افزایش قابل توجه (P<۰/۰۱) و دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم افزایش معنادار (P<۰/۰۵) ایجاد کردند (نمودار ۵).

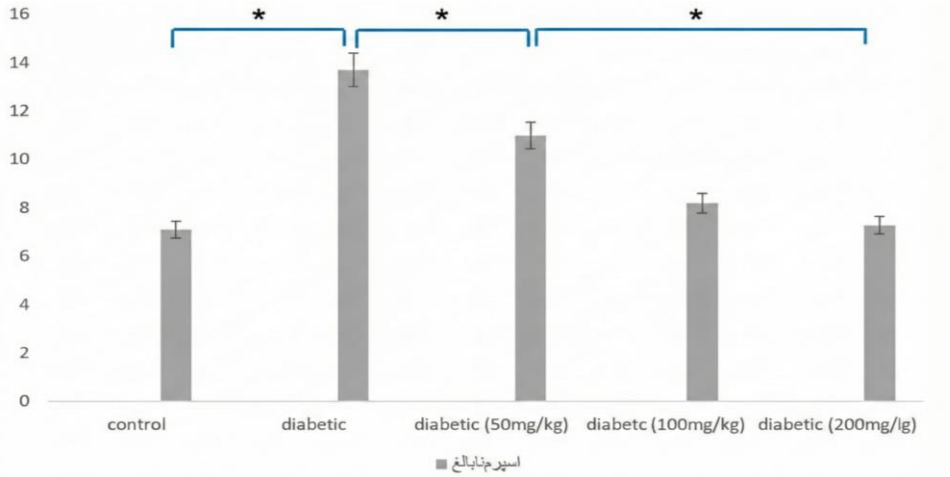
اثر تجویز دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه بر کاهش اسپرم‌های نابالغ

در گروه دیابتی، درصد اسپرم‌های نابالغ به‌طور قابل توجهی افزایش یافته بود. درمان با عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه موجب کاهش معنی‌دار درصد اسپرم‌های نابالغ شد؛ دوزهای ۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم کاهش قابل توجه (P<۰/۰۱) و دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم کاهش معنادار (P<۰/۰۵) ایجاد کردند (نمودار ۶).



نمودار ۵- میانگین سطح تستوسترون در گروه‌های کنترل، دیابتی و تیمار عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه به روش تزریق داخل صفاقی (Mean±SEM) (P<۰/۰۵).

علامت * نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری (P<۰/۰۵) بین گروه‌های مشخص شده است.



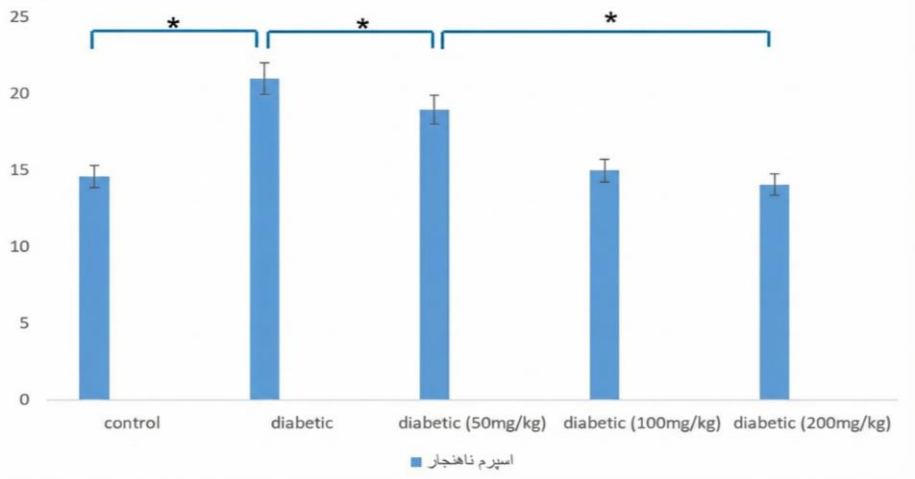
نمودار ٦- میانگین تعداد اسپرم نابالغ در گروه‌های کنترل، دیابتی و تیمار عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه به روش تزریق داخل صفاقی (Mean±SEM) (P<۰/۰۵).

علامت * نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری (P<۰/۰۵) بین گروه‌های مشخص شده است.

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.223]

اثر تجویز دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه بر کاهش اسپرم‌های ناهنجار

در گروه دیابتی، درصد اسپرم‌های ناهنجار به‌طور قابل توجهی افزایش یافته بود. درمان با عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه موجب کاهش معنی‌دار درصد اسپرم‌های ناهنجار شد؛ دوزهای ۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم کاهش قابل توجه ($P<۰/۰۱$) و دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم کاهش معنادار ($P<۰/۰۵$) ایجاد کردند (نمودار ۷).



نمودار ۷- میانگین تعداد اسپرم ناهنجار، در گروه‌های کنترل، دیابتی و تیمار عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه به روش تزریق داخل صفاقی (Mean±SEM) ($P<۰/۰۵$).

علامت * نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری ($P<۰/۰۵$) بین گروه‌های مشخص شده است.

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دیابت نوع یک با ایجاد هیپرگلیسمی پایدار، استرس اکسیداتیو و اختلال در محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–گناد، موجب کاهش شدید توان تولیدمثلی در موش‌های نر می‌شود (۱،۳). تجویز عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه در این مطالعه توانست بخش قابل توجهی از این اختلالات را تعدیل کند که احتمالاً ناشی از وجود ترکیبات فعال زیستی به‌ویژه تیموکینون، با خواص قوی آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی است (۶،۹).

در این پژوهش، دیابت نوع یک موجب کاهش معنی‌دار نرخ لقاح شد و درمان با عصاره سیاه‌دانه توانست این شاخص را به‌صورت وابسته به دوز بهبود دهد. نتایج مشابهی در مدل‌های مختلف دیابت گزارش شده است؛ مطالعاتی که کاهش شدید باروری در موش‌های دیابتی (۱۲) و همچنین اثرات بارورسازی عصاره سیاه‌دانه را در موش‌های نر نشان می‌دهد (۱۰). یافته‌های جدیدتر نیز نشان داده‌اند که دیابت، کیفیت گامت پدری را کاهش داده و در نتایج IVF اختلال ایجاد می‌کند (۱۷). همسویی نتایج حاضر با این شواهد نشان می‌دهد که تیموکینون با کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود عملکرد اسپرم قادر است نرخ لقاح را در شرایط دیابتی بازسازی کند.

در این مطالعه، دیابت موجب کاهش معنی‌دار جنین‌های دو سلولی شده بود که در اثر اختلال رشد اولیه جنین در اثر آسیب‌های وارده به اسپرم ایجاد شده بود. این موضوع پیش‌تر نیز گزارش شده و مشخص گردید که کیفیت پایین اسپرم‌های دیابتی باعث توقف رشد جنین در مراحل اولیه می‌شود (۳، ۵). پس از تجویز عصاره سیاه‌دانه، درصد جنین‌های دو سلولی افزایش یافت؛ یافته‌ای که با گزارش‌های منتشر شده در رابطه با افزایش قابلیت لقاح و بهبود کیفیت جنین‌ها در اثر مصرف سیاه‌دانه (۱۰) و همچنین اثرات دیابت T1DM بر کاهش رشد جنین‌های اولیه و تأخیر در تقسیمات سلولی هم‌خوانی دارد (۱۷).

کاهش جنین‌های چهارسلولی در گروه دیابتی، مشابه سایر مطالعاتی است که نقص در تکامل جنین‌های اولیه در اثر دیابت را نشان

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.223]

داده‌اند (۳، ۵، ۱۸). تیمار با دوزهای متوسط و بالا از عصاره سیاه‌دانه موجب افزایش معنی‌دار جنین‌های چهارسلولی شد. این موضوع نشان‌دهنده اثر حفاظتی تقویت آنتی‌اکسیدانی بر مراحل تقسیمات اولیه است. مطالعاتی که اثرات تیموکینون بر بهبود کیفیت گامت و جنین در مدل‌های حیوانی را گزارش کرده‌اند (۸، ۹، ۱۸)، نشان می‌دهد که تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌تواند روند رشد اولیه جنین را در شرایط آسیب‌زا بهبود دهد.

کاهش TAC یکی از یافته‌های ثابت در مدل‌های دیابتی است و این مطالعه نیز کاهش آن را در گروه کنترل دیابتی تأیید کرد. مشابه مطالعاتی که کاهش TAC و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی را گزارش کرده بود (۱۲)، نتایج حاضر نیز نشانگر تخریب دفاع اکسیداتیو بود. تجویز عصاره سیاه‌دانه موجب افزایش معنادار TAC شد که با مطالعات مرتبط با توان آنتی‌اکسیدانی سیاه‌دانه (۶، ۷) و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی تیموکینون همسو است (۸). یافته‌های دیگری نیز نشان داد که سیاه‌دانه با افزایش فعالیت SOD و GPx می‌تواند ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بافت تولیدمثلی را بازیابی کند (۱۹).

مطابق انتظار، تستوسترون در گروه دیابتی کاهش یافت که در اثر اختلال محور HPG درنتیجه دیابت ایجاد شد (۳،۴). در مطالعه حاضر، سیاه‌دانه سطح تستوسترون را به‌صورت وابسته به دوز افزایش داد. این اثر قبلاً در گزارش‌هایی مشاهده شده بود (۱۰). همچنین در گزارش‌هایی که تأثیر تیموکینون بر تحریک سلول‌های لیدیگ و افزایش سنتز استروئیدوژنیک را بررسی کردند (۷، ۸)، سیاه‌دانه قادر است در شرایط استرس اکسیداتیو، سلول‌های لیدیگ را حفظ و سطح تستوسترون را افزایش دهد (۱۹). این همسویی نشان می‌دهد افزایش تستوسترون در مطالعه حاضر، کاملاً قابل توجیه است.

در این پژوهش درصد اسپرم‌های نابالغ و دارای ناهنجاری ساختاری در گروه دیابتی افزایش یافت. این یافته با گزارش‌های مطالعات قبلی که نشان داده‌اند دیابت باعث اختلال در اسپرمیوژنز و افزایش آسیب DNA می‌شود کاملاً همسو است (۳،۱۴). پس از درمان با سیاه‌دانه، درصد اسپرم‌های نابالغ و ناهنجار کاهش معنی‌داری یافت. این اثر با سایر یافته‌ها و بررسی‌ها مولکولی همسو است (۱۰-۸). همچنین سایر گزارش‌ها نشان می‌دهد که سیاه‌دانه باعث کاهش آسیب‌های ساختاری اسپرم و بهبود تراکم کروماتینی آن می‌شود (۳،۴،۸،۱۸). بنابراین مطالعه حاضر تأیید می‌کند که عصاره سیاه‌دانه قادر است کیفیت اسپرم را در مدل دیابتی بهبود دهد.

نتایج این مطالعه نشان داد عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه با بهبود شاخص‌های اصلی باروری شامل نرخ لقاح، کیفیت مراحل اولیه رشد جنین، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، سطح تستوسترون و بلوغ اسپرم، می‌تواند اثرات منفی دیابت نوع یک را تعدیل کند. این اثرات مطابق شواهد علمی پیشین است و احتمالاً از طریق کاهش استرس اکسیداتیو، بهبود عملکرد بیضه و تقویت فرآیند اسپرمیوژنز حاصل می‌شود. با توجه به یافته‌های حاضر، کاربرد سیاه‌دانه به‌عنوان گزینه کمکی در مدیریت اختلالات باروری ناشی از دیابت قابل پیشنهاد است؛ با این حال، انجام مطالعات بالینی بیشتر برای تعمیم این نتایج ضروری است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه، به‌ویژه در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، می‌تواند اثرات مخرب دیابت نوع یک را بر شاخص‌های باروری برون‌تنی در موش‌های سوری نر کاهش دهد. این بهبود از طریق افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، افزایش سطح تستوسترون، کاهش درصد اسپرم‌های نابالغ و ناهنجار و افزایش نرخ لقاح و تکامل جنین‌های دوسلولی و چهارسلولی حاصل شد. این اثرات احتمالاً به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی تیموکینون و سایر ترکیبات فعال سیاه‌دانه است که از طریق کاهش استرس اکسیداتیو، محافظت از سلول‌های لیدیگ و بهبود فرآیند اسپرمیوژنز عمل می‌کنند. این یافته‌ها پتانسیل سیاه‌دانه را به‌عنوان یک عامل مکمل درمانی در بهبود باروری مردان دیابتی تأیید می‌کند. با این حال، برای تعمیم این نتایج به انسان، انجام مطالعات بالینی، بررسی مکانیسم‌های مولکولی دقیق‌تر و ارزیابی ایمنی دوزهای مختلف ضروری است. پیشنهاد می‌شود تحقیقات آینده بر بررسی اثرات طولانی‌مدت سیاهدانه و ترکیبات فعال آن بر محور HPG[1] و کیفیت گامت‌ها در مدل‌های انسانی تمرکز کنند.

[1] Hypothalamic–Pituitary–Gonadal axi

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.223]

تقدیر و تشکّر

این مقاله حاصل پایان‌نامه دوره دکتری حرفه‌ای دامپزشکی با عنوان «اثرات محافظتی عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه بر توان باروری موش‌های سوری دیابتی نوع یک» است که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه به تصویب رسیده و اجرا شده است. بدین‌وسیله نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی و پرسنل آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه جهت همکاری در اجرای این طرح اعلام می‌دارند.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر با رعایت کامل اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی و دستورالعمل‌های ملی حفاظت از حیوانات مورد استفاده در امور علمی انجام شده است. پروتکل اجرایی این پژوهش توسط شورای پژوهشی و کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه بررسی و با شناسه اخلاق اختصاصی IR.IAU.URIMA.REC.1403.079 به تصویب رسیده است.

حمایت مالی

این پژوهش با هزینه شخصی نویسندگان انجام شده است و از امکانات، فضای آزمایشگاهی و تجهیزات دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه جهت پیشبرد اهداف طرح استفاده گردیده است.

مشارکت نویسندگان

هومن محمدبیگی (نویسنده اول) در انجام عملیات آزمایشگاهی، جمع‌آوری داده‌ها، تیمار حیوانات و نگارش پیش‌نویس اولیه مقاله مشارکت داشته است .محمدرضا حسینچی (نویسنده مسئول) طراحی مطالعه، نظارت بر کلیه مراحل اجرا، تحلیل آماری داده‌ها و بازنگری و تأیید نهایی متن مقاله را بر عهده داشته است. تمامی نویسندگان معیارهای لازم برای نویسندگی را داشته و مسئولیت محتوای علمی ارائه شده را می‌پذیرند.

تضاد منافع

نویسندگان این مقاله صریحاً اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی (اعم از مالی، تجاری، شخصی یا سازمانی) که بتواند بر نتایج یا تفسیر یافته‌های این پژوهش تأثیر بگذارد، وجود ندارد.

منابع

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2020;43(Suppl 1): S14-S31. URL: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2797383/
2. Hasan MM, Al-Kuraish S. The protective properties of hydro-alcoholic extract of Nigella sativa on male reproductive system in type 2 diabetes rat. Health Biotechnol Biopharma (HBB). 2019؛3(1):45-56. https://www.healthbiotechpharm.org/article_133331.html
3. Graziani A, Scafa R, Grande G, Ferlin A. Diabetes and male fertility disorders. Mol Aspects Med. 2024;99:101303. https://doi.org/10.1016/j.mam.2024.101303.
4. Dena SM, Adeleye AO, Mohlala K, Langa BC, Opuwari CS. The Impact of Diabetes Mellitus-Related Oxidative Stress on Male Fertility: A Review. J Diabetes. 2025 Oct;17(10):e70157. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41123473/
5. Tavakkoli A, Mahdian V, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Review of clinical trials on black seed (*Nigella sativa*) and its active compound, thymoquinone. *J Pharmacopuncture*. 2017 Sep;20(3):179-93. DOI: 10.3831/KPI.2017.20.021. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30087794/
6. Amin B, Hosseinzadeh H. Black Cumin (Nigella sativa) and Its Active Constituent, Thymoquinone: An Overview on the Analgesic and Anti-inflammatory Effects. *Planta Med.* 2015;82(1-02):17–27. doi:10.1055/s-0035-1557838. https://www.researchgate.net/publication/281779592_Black_Cumin_Nigella_sativa_and_Its_Active_Constituent_Thymoquinone_An_Overview_on_the_Analgesic_and_Anti-inflammatory_Effects

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.223]

7. Alberts A, Moldoveanu E-T, Niculescu A-G, Grumezescu AM. Nigella sativa: A Comprehensive Review of Its Therapeutic Potential, Pharmacological Properties, and Clinical Applications. Int J Mol Sci. 2024;25(24):13410. DOI:10.3390/ijms252413410. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39769174/

8. Shaukat A, Zaidi A, Anwar H, Kizilbash N. Mechanism of the antidiabetic action of Nigella sativa and Thymoquinone: a review. *Front Nutr*. 2023;10:1126272. DOI:10.3389/fnut.2023.1126272. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37818339/

9. Parandin R, Yousofvand N, Ghorbani R. The enhancing effects of alcoholic extract of Nigella sativa seed on fertility potential, plasma gonadotropins and testosterone in male rats. Iran J Reprod Med. 2012;10(4):355–362. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25246898/

10. Modarresi M. Comparative study of the effects of garlic, black elderberry, and Nigella sativa extracts on white blood cell counts and blood protein components in laboratory mice. Zist Shenasi Janvari (Animal Biology). 2011;3(3). https://journals.iau.ir/article_530519.html

11. Keramati R, Najafi G, Seyrafi R, Shalizar‐Jalali A. The protective effect of catechin on fertility in streptozotocin‐induced diabetic male mice. J Babol Univ Med Sci. 2023 Mar 10;25(1):221‐32. DOI:10.22088/jbums.25.1.221. URL: http://jbums.org/article-1-10640-en.html

12. Heydari T, Shalizar‐Jalali A, Esmaeilnejad B, Najafi G, Rostami H. Babesiosis causes reproductive dysfunction in splenectomized mice: a proof of concept in vitro study. Iranian Journal of Veterinary Surgery. 2022 Apr 1;17(1):50‐54. DOI:10.30500/IVSA.2022.314467.1285

https://www.researchgate.net/publication/359187703_Babesiosis_Causes_Reproductive_Dysfunction_in_Splenectomized_Mice_A_Proof_of_Concept_in_Vitro_Study

13. Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reprod Toxicol*. 1996 May-Jun;10(3):237-44. DOI:10.1016/0890-6238(96)00028-7. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8738562/

14. Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL. The Laboratory Rat. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 2006. p. 165–173. https://books.google.com/books/about/The_Laboratory_Rat.html?id=zJWgc-QBIUYC

15. Takeo T, Nakagata N. In vitro fertilization in mice. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018 Jun 1;2018(6). DOI:10.1101/pdb.prot094524. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29669849/

16. Golkar-Narenji A, Gourabi H, Eimani H, Barekati Z, Akhlaghi A. Superovulation, in vitro fertilization (IVF) and in vitro development (IVD) protocols for inbred BALB/cJ mice in comparison with outbred NMRI mice. Reprod Med Biol. 2012 Apr 7;11(4):185–192. DOI: 10.1007/s12522-012-0127-8. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29699122/

17. Alyürük B, Yazir Y, Korun ZU, Budak Ö, Kalyan EY, Kılıç KC. Impacts of type 1 diabetes on male fertility and embryo quality in mice. Tissue Cell. 2025;95:102941. doi:10.1016/j.tice.2025.102941. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40315694/

18. Hannan MA, Rahman MA, Sohag AAM, Uddin MJ, Dash R, Sikder MH, et al. Black Cumin (Nigella sativa L.): A Comprehensive Review on Phytochemistry, Health Benefits, Molecular Pharmacology, and Safety. Nutrients. 2021;13(6):1784. DOI:10.3390/nu13061784. https://www.mdpi.com/2072-6643/13/6/1784

19. Abd-Elkareem M, Abd El-Rahman MAM, Abou Khalil NS, Amer AS, et al. Antioxidant and cytoprotective effects of Nigella sativa L. seeds on the testis of monosodium glutamate challenged rats. *Sci Rep*. 2021;11:13519. DOI:10.1038/s41598-021-92977-4. https://www.nature.com/articles/s41598-021-92977-4

[DOI: 10.61882/JBUMS.32.3.223]