



## اثرات دیابت القاء شده توسط استرپتوزوتوسین بر پارامترهای باروری اسپرم، هموگلوبین گلیکوزیله و کلسترول تام در موش‌های سوری

علی سوخته‌زاری<sup>۱\*</sup>، مسعود علی‌رضایی<sup>۲</sup>، آرش خردمند<sup>۳</sup>، امید دزفولیان<sup>۴</sup>

### چکیده

مقدمه: هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی اثرات مدل دیابت مدل القاء شده به وسیله استرپتوزوتوسین بر پارامترهای باروری اسپرم، هموگلوبین گلیکوزیله و کلسترول تام به عنوان شاخص‌های متابولیسم لیپید بود.

روش بررسی: القاء دیابت قندی به وسیله تزریق زیرجلدی ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از استرپتوزوتوسین در ۱۰ سر موش سوری انجام شد. در حالیکه گروه کنترل تنها ۰/۲۵ سی‌سی آب مقطر به همان صورت دریافت کردند. از موش‌هایی که یک هفته پس از تزریق استرپتوزوتوسین قند خون بیش از حد آستانه (۳۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) داشتند، ۸ سر برای گروه دیابت انتخاب شد. دو هفته پس از تأیید دیابت، همه موش‌ها کشته شده، خون کامل از قلب آنها گرفته شد و بیضه‌ها برای مطالعه هیستوپاتولوژی و ارزیابی اسپرم برداشته شدند. حرکت کلی اسپرم، حرکت پیشرونده روبه جلو، آزمایش عملکرد غشاء و غلظت اسپرم به وسیله روش‌های مرسوم مشخص شد و هموگلوبین گلیکوزیله و کلسترول تام با روش‌های شیمیایی به وسیله اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شدند.

نتایج: حیوانات دیابتیک کاهش معنی‌داری در غلظت اسپرم ( $P < 0/01$ ) و افزایش هموگلوبین گلیکوزیله و کلسترول تام در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند ( $P < 0/01$ ). رابطه خطی منفی و معنی‌داری بین غلظت اسپرم و هموگلوبین گلیکوزیله در گروه دیابتیک مشاهده شد ( $R^2 = 0/90$ ،  $p = 0/012$ ). واکوئله شدن سلول‌های اپیتلیال مجاری سمینفر در گروه دیابتیک نسبت به گروه کنترل دیده شد و مجاری اپیدیدیم در کنترل‌ها حجم اسپرماتوزوئید بیشتری در مقایسه با موش‌های دیابتیک نشان دادند.

نتیجه‌گیری: دیابت با کاهش غلظت اسپرم در ناحیه اپیدیدیم خلفی، حتی در مدت دو هفته پس از القاء هیپرگلیسمی در این مدل آزمایشی همراه شده است که می‌تواند به عنوان شاخصی برای پیش‌بینی باروری پائین باشد. درصد هموگلوبین گلیکوزیله یک رابطه منفی با غلظت اسپرم نشان داد و هیپرکلسترولمی همچنین در مراحل اول دیابت بیانگر یک اختلال در متابولیسم لیپیدها است که به وسیله تغییرات بافت‌شناسی بیضه تأیید گردید.

واژه‌های کلیدی: دیابت، استرپتوزوتوسین، اسپرم، هموگلوبین گلیکوزیله، کلسترول

۱- استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد

۲- دانشیار، بخش بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد

۳- دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد

۴- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۶۱۶۱۱۲۹۰، پست الکترونیکی: asookhthezary@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۲۱

## مقدمه

دیابت قندی از نظر بالینی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های غدد درون‌ریز است که بر اساس پیش‌بینی به عمل آمده، بروز آن در آینده در جامعه انسانی افزایش خواهد یافت (۱). دیابت قندی شامل گروه ناهمگونی از بیماری‌های متابولیک است که مشخصه آنها هیپرگلیسمی و اختلال در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و پروتئین‌ها می‌باشد. این بیماری بر اثر نقایصی در ترشح انسولین، اثرگذاری انسولین و یا هر دوی آنها پدید می‌آید و از نظر بالینی یکی از مهمترین عوامل بروز برخی از اختلالات مثل نفروپاتی، رتینوپاتی، نوروپاتی، بیماری‌های قلبی-عروقی و اختلالات مربوط به ناباروری در مردان می‌باشد (۱،۲).

دو عاملی که سهم بیشتری در پیشرفت دیابت قندی و ایجاد اختلالات ناشی از آن دارند، استرس اکسیداتیو و اختلالات لیپیدی است. هایپرلیپیدمی که یک اختلال بارز در افراد مبتلا به دیابت قندی است در صورت عدم کنترل صحیح منجر به بیماری‌های قلبی-عروقی می‌شود که این در مبتلایان به دیابت نوع یک شایع است (۱، ۳-۵). استرس اکسیداتیو عامل مهم دیگری در پیشرفت بیماری بوده، به طوریکه امروزه از القاء دیابت توسط استرپتوزوتوسین (STZ)، ایجادکننده استرس اکسیداتیو در سلول‌های بتا پانکراس، به عنوان یک مدل استفاده می‌شود (۲).

مکانیسم عمل STZ بدین صورت است که از طریق یک ناقل گلوکز (GLUT2) وارد سلول‌های بتا پانکراس شده و باعث فرآیند آلکیل‌شدن در DNA می‌شود و نتیجه آن تشکیل رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل است که سبب تولید استرس اکسیداتیو می‌گردند. علاوه بر این STZ باعث آزاد شدن مقادیر سمی نیتریک اکسید شده که در تخریب DNA شرکت می‌کند. بنابراین عمل STZ تخریب سلول‌های بتا پانکراس طی نکرور است و باعث دیابت قندی می‌گردد (۴).

دیابت ممکن است از چندین روش بر سیستم تولید مثل جنس نر مانند اثر بر روی کنترل اندوکراین اسپرماتوژنز، روند اسپرماتوژنز به تنهایی و یا اختلال در نعوظ آلت تناسلی و انزال، باعث کاهش باروری و یا ناباروری گردد (۴). مطالعات زیادی درخصوص بررسی اثر دیابت بر کنترل اندوکراین و اسپرماتوژنز وجود دارند و نتایج این

مطالعات بیانگر کاهش باروری به خاطر اختلال در عملکرد سیستم تولید مثل است (۸-۱۰).

اگرچه نتایج متفاوتی در مورد حجم مایع منی، حرکت کلی و یا پیشرونده اسپرم و یا غلظت اسپرم‌ها در مطالعات مختلف موش‌های دیابتیک وجود دارد (۹)، ولی به طور کلی دیابت در اکثر موارد در مدت طولانی پس از القاء آن بررسی شده است و اثر دیابت قندی در کوتاه مدت بر فاکتورهای مرتبط با تحرک و باروری اسپرم و هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) همراه با اختلالات لیپیدی در حیوانات آزمایشگاهی بررسی نشده است.

هدف از انجام این مطالعه بررسی فاکتورهای مرتبط با باروری اسپرم و شواهد بیوشیمیایی و بافت‌شناسی بیضه در مدت کوتاه (دو هفته) پس از ایجاد دیابت در موش‌های سوری بود. در واقع هدف از انجام این مطالعه بررسی ارتباط فاکتورهای باروری اسپرم با هموگلوبین گلیکوزیله، به عنوان شاخص دیابتیک و افزایش قند خون و همچنین بررسی زود هنگام اختلالات لیپیدی ناشی از دیابت قندی در مدل تجربی موش‌های سوری بود.

## روش بررسی

۲۰ سر موش سوری نر بالغ با وزن ۳۵-۳۰ گرم با دسترسی آزاد به آب و غذا و چرخه تاریکی و روشنایی ۱۲/۱۲ ساعت با شرایط تهویه مناسب بر اساس پروتکل اخلاقی و حمایت از حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه لرستان به طور تصادفی به دو گروه ده تایی تقسیم و به صورت زیر درمان شدند: ۱- کنترل: ۰/۲۵ میلی‌لیتر نرمال سالین به صورت زیر جلدی در ساعت ۸ صبح روز اول فقط یک مرتبه تزریق گردید. ۲- دیابتیک (بیمار): استرپتوزوتوسین (STZ) با دوز ۲۰۰ mg/kg حل شده در سیترات بافر ۰/۱ مولار pH=5 به صورت زیر جلدی در ساعت ۸ صبح روز اول فقط یک مرتبه تزریق گردید (۸).

جهت اطمینان از دیابتی‌شدن حیوان‌ها، قند خون آنها ۶ روز پس از تزریق STZ با کمک لنست و گلوکومتر (اکوا چک، آلمان) از سیاهرگ دمی موش‌ها اندازه‌گیری شد و قند خون بیش از ۳۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر به عنوان شاخص دیابتی شدن در نظر گرفته شد (۹). علاوه بر این، به مدت سه روز پیوسته بالا بودن قند

خون آنها مورد بررسی قرار گرفت و پس از اطمینان از دیابتی بودن، تعداد هشت سر موش در هر گروه قرار گرفت. دو هفته پس از تایید دیابتی شدن موش‌ها (روز بیست و دوم آزمایش) پس از بیهوشی خفیف با دی اتیل اتر خون‌گیری از قلب جهت تهیه سرم و خون کامل به عمل آمد آنگاه هر دو گروه کشتار شده، بیضه‌ها از محوطه بطنی خارج و بیضه سمت راست بلافاصله جهت ارزیابی پارامترهای باروری اسپرم مورد استفاده و بیضه سمت چپ برای تهیه مقاطع بافت‌شناسی در محلول بوئن قرار گرفت و پس از پاساژ بافت در پارافین قالب‌گیری، مقاطع ۵ میکرومتر تهیه و با هماتوکسیلین اتوزین رنگ‌آمیزی شد. نمونه‌های خون کامل برای تهیه همولیزه و تعیین درصد هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) و سرم برای ارزیابی کلسترول تام جدا گردیدند. در زمان انجام آزمایشات درصد HbA1c با استفاده از کیت کروماتوگرافی تعویض یون (BioSystems, Barcelona, Spain) و کلسترول تام با استفاده از یک کیت شرکت زیست شیمی (زیست شیمی، تهران، ایران) مطابق دستور شرکت‌های سازنده کیت‌ها تعیین گردید.

#### ارزیابی اسپرم

بلافاصله پس از کشتن موش‌ها، بیضه سمت راست در دو گروه کنترل و دیابتیک برداشته شد و سپس دم اپی دیدیم از بیضه موش‌ها جدا شد. روش جمع‌آوری اسپرم براساس روش کانسل و همکاران (۱۱) انجام شد. به این ترتیب که دم اپی دیدیم در ۲ میلی‌لیتر محلول سالین نرمال با قیچی کاملاً ریز شده و به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه جهت خروج اسپرم‌ها از لوله‌های اپی دیدیم نگهداری گردید. اسپرم‌های هر دو گروه جهت بررسی حرکات کلی و پیشرونده، سالم بودن غشاء اسپرم (آزمایش HOS, Hypoosmotic swelling test) و غلظت ارزیابی شدند. ارزیابی درصد اسپرم‌های با حرکت پیشرونده براساس روش سونمز و همکاران (۱۲) انجام شد. بر این اساس، ۲۰ میکرولیتر از مایع استحصالی از اپی دیدیم خلفی در یک سی‌سی سالین نرمال رقیق شده و محلول حاصل روی لام قرار گرفته و در زیر میکروسکوپ و با بزرگنمایی ۴۰۰ مشاهده شدند. تخمین درصد حرکت اسپرم‌ها براساس مشاهده حرکات در چهار نقطه متفاوت از لام و با شمارش حداقل ۱۰۰ اسپرم و توسط یک نفر انجام شد.

جهت ارزیابی سالم بودن غشاء از آزمون HOS براساس روش اسلیوا و ماکورا (۱۳) استفاده شد. بر این اساس، مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول اسپرم به ۰/۴ میلی لیتر آب مقطر اضافه شده و مجموعاً به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها خارج شده و درصد اسپرم‌های با دم خمیده (به عنوان غشاء سالم) و با استفاده از میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۴۰۰ محاسبه می‌شدند. اسپرم‌های با دم خمیده تحت عنوان HOS مثبت تلقی می‌گردند. برای تعیین غلظت اسپرم‌ها، ۵۰ میکرولیتر از اسپرم استحصالی به داخل ۱ سی‌سی فرمالین سالین اضافه شده تا نسبت رقت ۲۰ : ۱ به دست آید. سپس ۱۰ میکرولیتر از این نمونه اسپرم رقیق‌شده به لام هماسیتومتر و در زیر میکروسکوپ نوری منتقل شده و تعداد اسپرم در هر میلی‌لیتر محاسبه گردید.

#### آنالیز آماری

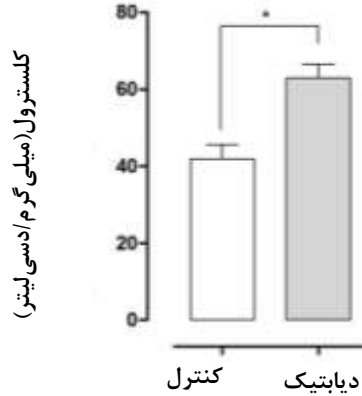
میانگین مقادیر و خطای استاندارد (SE) به دست آمده از متغیرها با استفاده از آزمون تی‌تست مستقل (Independent t-Test) با استفاده از نرم‌افزار SPSS 19 در گروه کنترل و دیابتیک با هم مقایسه شدند و سطح معنی‌دار  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد. قبل از آن نرمال بودن داده‌ها بررسی و از آزمون لون برای همگن بودن واریانس‌ها استفاده شد. برای بررسی ارتباط بین غلظت اسپرم و درصد هموگلوبین گلیکوزیله (به عنوان شاخص افزایش قند خون و دیابتیک) از آزمون همبستگی پیرسون و سپس از آزمون رگرسیون خطی (Linear Regression) استفاده گردید.

#### نتایج

نتایج نشان داد که ایجاد دیابت قندی با STZ در موش‌های سوری باعث کاهش معنی‌داری ( $p = 0/002$ ) در تعداد و غلظت اسپرم‌ها در گروه دیابتیک در مقایسه با گروه کنترل گردید  $3/98 \pm 85/20$  میلیون در هر سی‌سی در گروه کنترل در مقابل  $4/69 \pm 58/00$  میلیون در گروه دیابتیک (جدول ۱)، ولی کاهش معنی‌داری در حرکات کلی و پیشرونده اسپرم تا روز ۲۲ مشاهده نشد ( $p = 0/516$ ). همچنین افزایش قند خون در این موش‌ها نتوانست تأثیر معنی‌داری را در میزان عملکرد غشاء اسپرم (HOS test) موش‌های مبتلا به دیابت در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نماید ( $p = 0/451$ ).

همچنین مشخص گردید که ارتباط منفی و معنی‌داری بین هموگلوبین گلیکوزیله و غلظت اسپرم در موش‌های دیابتیک وجود دارد ( $p=0/012$ ،  $R^2=0/90$ ).

در خصوص افزایش قند خون و اثر آن بر هموگلوبین گلیکوزیله (شکل ۱)، مشخص شد که درصد هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) در گروه دیابتیک نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری دارد



شکل ۱: اثر دیابت القاء شده توسط استرپتوزوتوسین بر درصد هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) در موش‌های سوری. \* بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار بین گروه کنترل و دیابتیک است ( $p = 0/019$ ).

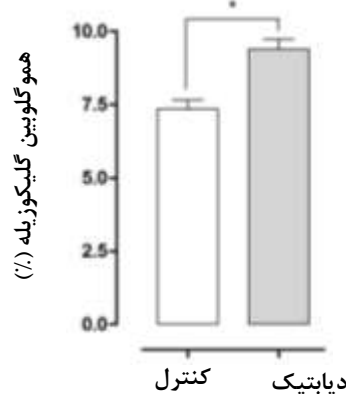
جدول ۱: میانگین ± خطای استاندارد پارامترهای باروری اسپرم در گروه‌های کنترل و دیابتیک

پارامترهای باروری اسپرم	گروه کنترل	گروه دیابتیک
حرکت توتال اسپرم (%)	42.6 ± 4.71	51.4 ± 8.68
حرکت پیشرونده اسپرم (%)	24.8 ± 6.36	30.6 ± 5.68
HOS (%)	63.6 ± 8.23	53.4 ± 9.9
غلظت اسپرم در سی‌سی (میلیون)	85.2 ± 3.98 <sup>a</sup>	58.0 ± 4.69 <sup>b</sup>

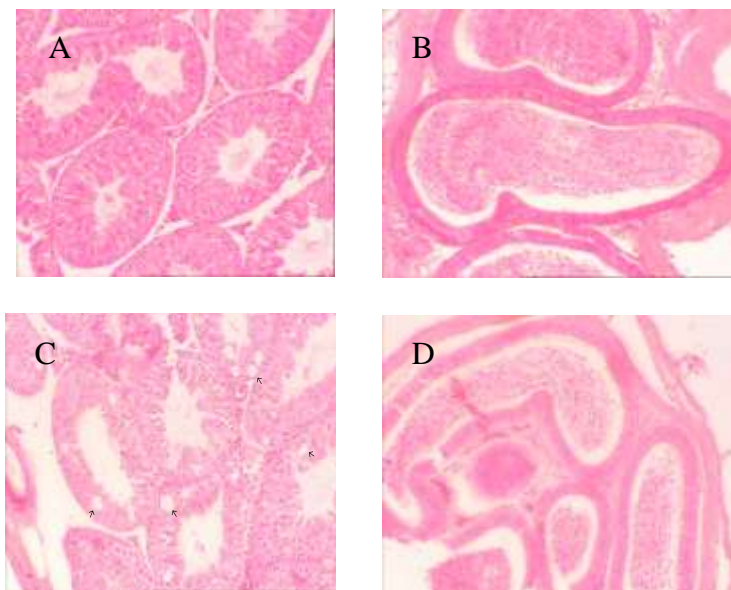
a, b بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار بین گروه کنترل و دیابتیک در غلظت اسپرم از موش‌های سوری است ( $p=0/002$ ).

مقایسه با گروه کنترل نشان دادند و حجم اسپرماتوزوئید کمتری در مجاری اپیدیدیم موش‌های دیابتیک نسبت به گروه کنترل دیده شد (شکل ۳).

در خصوص اختلالات لیپیدی، دیابت قندی در کوتاه مدت باعث افزایش معنی‌دار کلسترول تام در گروه دیابتیک نسبت به گروه کنترل شد ( $p = 0/036$ ). (شکل ۲). سلول‌های زایا لوله‌های سمینفر گروه دیابتیک تغییرات واکنش‌دهنده ۱، د



شکل ۲: اثر دیابت القاء شده توسط استرپتوزوتوسین بر کلسترول تام (میلی‌گرم در دسی لیتر از سرم) در موش‌های سوری. \* بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار بین گروه کنترل و دیابتیک است ( $p = 0/036$ ).



شکل ۳: اثر دیابت القاء شده توسط استرپتوزوتوسین بر بافت ناحیه اپیدیدیم بیضه موش‌های سوری.

A, B بافت بیضه و اپیدیدیم گروه کنترل بیانگر عدم تغییرات بافت شناسی است. درحالی‌که C تغییرات سلول‌های اپیتلیال مجرای سمینفر و واکنش شدن سلول‌ها (پیکان‌ها) D- کاهش غلظت و حجم اسپرماتوزوئیدها در اپیدیدیم خلفی از موش‌های دیابتیک را نشان می‌دهد.

### بحث

شده قبلی مشاهده نشد (۹،۱۴). دلیل دیگر افزایش اندک تحرک در گروه دیابتیک می‌تواند احتمالاً فراهم‌شدن سوبسترای مصرفی اسپرم‌ها، لاکتات بیشتر، پس از له‌کردن اپیدیدیم در محیط انکوباتور باشد. احتمالاً در این زمان سد خونی-بیضه‌ای (Blood-Testis-Barrier) که در حالت نرمال وجود دارد (۱۵) از بین رفته و آزادشدن لاکتات، محصول متابولیسم گلوکز در سلول‌های اپیدیدیم، انرژی لازم را برای حرکت توتال و روبه جلو اسپرم فراهم می‌کند. با این حال لازم است این نکته در مطالعات آینده با دقت بیشتری بررسی گردد.

مدل تجربی القاء دیابت به وسیله استرپتوزوتوسین به طور متداول در مطالعات استفاده شده است و تغییراتی را در سیستم تولید مثل به عنوان بخشی از بیماری توضیح می‌دهد (۹). در این مطالعه آزمایش HOS در مدت کوتاه پس از القاء دیابت تحت تاثیر قرار نگرفت و نشان می‌دهد که دیابت به تنهایی اثرات سمی بر اسپرماتیدها ندارد. نتایج بافت‌شناسی در بیضه نیز این نکته را تأیید کرد و به نظر می‌رسد کاهش تعداد اسپرم در لوله‌های منی‌ساز بیضه و اپیدیدیم به علت کاهش سطح تستوسترون و گنادوتروپین‌ها باشد (۸). در این خصوص مشخص گردیده است که دیابت از طریق کنترل اندوکراین روند اسپرماتوزن را تحت تاثیر

ویژگی این مطالعه فراهم‌کردن شواهد بافت‌شناسی در کنار فاکتورهای مرتبط با باروری اسپرم همراه با بررسی هموگلوبین گلیکوزیله و اختلالات لیپیدی زود هنگام (افزایش کلسترول تام) در گروه موش‌های دیابتیک است.

با توجه به نتایج، غلظت اسپرم در ناحیه اپیدیدیم گروه دیابتیک نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری پیدا کرد و این کاهش به وضوح به وسیله مقاطع بافتی توضیح داده شد (شکل ۳) و مشخص گردید که این تفاوت به خاطر کاهش اسپرماتوزن بوده و مطابق با یافته‌های قبلی است (۸-۱۰). علاوه بر این آزمایش عملکرد غشاء (HOS test) مقادیر یکسانی را در گروه دیابتیک نسبت به گروه کنترل نشان داد و بیانگر این است که غشاء اسپرم در گروه دیابتیک به صورت معنی‌دار تحت تاثیر افزایش قند خون قرار نگرفته است. احتمالاً اثرات استرپتوزوتوسین جهت القاء دیابت در مدت زمان بیشتر آزمایش و یا وجود تعداد بیشتری موش در هر گروه جهت کشتار می‌توانست بعضی از پارامترهای ارزیابی اسپرم را دچار تغییرات معنی‌داری کند.

اگرچه یکی از دلایل افزایش حرکت اسپرم‌ها در گروه دیابتیک می‌تواند ناشی از افزایش میزان ال-کارنیتین باشد ولی تاثیر معنی‌داری از ال-کارنیتین بر تحرک اسپرم در مطالعات گزارش

FBS باید در حالت ناشتا از بیماران اندازه‌گیری شود و در برخی از بیماران دیابتیک این حالت امکان‌پذیر نیست و یا پس از مصرف هر وعده غذایی نمی‌شود قند خون را بررسی کرد، بنابراین از آزمایش هموگلوبین گلیکوزیله در این موارد می‌توان استفاده کرد که شاخص دقیق‌تری نسبت به FBS بوده، علاوه بر این آزمایش HbA1c، چگونگی قند خون را در زمان طولانی‌تر نشان می‌دهد (۲۱). بنابراین با توجه به رابطه معنی‌دار این تست با غلظت اسپرم در گروه دیابتیک (به عنوان مولفه اصلی معنی‌دار در این مطالعه) شاید بتوان از این تست نیز به عنوان شاخصی از وضعیت باروری افراد دیابتیک استفاده کرد. با این حال لازم است این نکته در یک آزمایش بالینی کنترل شده بررسی گردد.

هیچ شکی وجود ندارد که اسپرماتوژنز یک پروسه فعال متابولیکی است و نیازمند همکاری بین چندین نوع سلول در بافت بیضه است (۹،۱۵). یکی از این سلول‌ها، سلول‌های سرتولی است که مسئول تبدیل گلوکز به عنوان سوسترای متابولیسه سلول‌های جنسی به لاکتات به عنوان سوخت اصلی سلول‌ها است (۱۵). بیوپسی گرفته شده از مردان دیابتیک بیانگر تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌های بافت بیضه به خصوص سلول‌های سرتولی است که به میزان زیاد واکنش داده و دارای درجات متفاوتی از دژنراسیون هستند (۱۵،۲۲). این تغییرات دژنراتیو سبب تغییرات شدید در متابولیسم سلول‌های جنسی توسط سلول‌های سرتولی می‌گردد و اختلال در متابولیسم گلوکز باعث راه‌اندازی مسیر بتا-اکسیداسیون اسیدهای چرب شده و در بافت بیضه تولید کلاسترول و اسیدهای چرب غیر استرفیه می‌کند (۱۵،۲۳). علاوه بر این کاهش انسولین در بدن خود باعث افزایش متابولیسم اسیدهای چرب در بافت‌های دیگر و تولید کلاسترول و اختلالات لیپیدی از جمله اکسیداسیون LDL می‌گردد و زمینه را برای بروز ناباروری فراهم می‌کند (۴،۵). مشخص شده است افراد دیابتیک هم در بافت بیضه و هم در بافت کبد دچار افزایش تولید کلاسترول و اکسیداسیون LDL هستند که اسن مساله بیماری را پیچیده‌تر می‌کند (۴). در این مطالعه حتی در مدت کوتاه نیز اثرات القاء دیابت با استریتوزوتوسین بر تولید کلاسترول مشخص گردید و موش‌های دیابتیک کلاسترول تام بیشتری نسبت به کنترل‌ها

شدید قرار می‌دهد (۱۵، ۱۸-۱۶). در این مطالعه، موش‌های دیابتی اسپرم کمتری در بیضه تولید کردند و پیرو آن تعداد اسپرم کمتری در ناحیه اپیدیدیم وجود داشت که این خود می‌تواند باعث ناباروری یا کاهش باروری در گروه دیابتیک گردد. مطالعات بافت‌شناسی نیز تغییراتی را در بافت بیضه و مجرای سمینفر در مدت دو هفته پس از القاء دیابت در گروه بیمار نشان داد. در این خصوص مطالعه قبلی انجام شده در موش‌های صحرایی نیز یافته‌های مشابهی ارائه کرد (۸).

اخیراً شیوع بالا (۵۱٪) از کاهش باروری در بیماران دیابتی گزارش شده است (۱۵،۱۹). افزایش شیوع دیابت قندی در جهان به طور قطع سبب افزایش بروز ناباروری در مردان خواهد گردید (۷). ناباروری به طور کلی یک مشکل بهداشتی مهم در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته است که به میزان یک زوج از هر شش زوج رسیده است و این نیازمند مطالعه و ارائه راه حل مناسب است (۷). به نظر می‌رسد نقائص اسپرمی در ۴۵-۴۰٪ از زوج‌های نابارور وجود دارد و علاوه بر این در ۵۰ سال گذشته کاهش در کیفیت اسپرم‌ها دیده شده است (۱۵،۲۰) و مشخص گردیده است افزایش بروز بیماری‌های سیستمیک نظیر دیابت قندی بیشتر در کاهش باروری جنس نر شرکت می‌کند (۷).

در این مطالعه، هموگلوبین گلیکوزیله به عنوان شاخص افزایش قند خون در موش‌های دیابتیک افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد و ارتباط معکوس و معنی‌داری بین این شاخص و غلظت اسپرم‌ها در ناحیه اپیدیدیم خلفی ( $r = -0/95$ ) گروه دیابتیک نشان داد. امروزه استفاده از هموگلوبین گلیکوزیله به عنوان یک تست غربالگری برای دیابت قندی استفاده می‌شود. این تست دارای مزایایی نسبت به تست‌های دیگر از جمله تست تحمل خوراکی گلوکز، گلوکز ۲ ساعته و قند خون ناشتا (FBS) است (۲۱). اندازه‌گیری HbA1c در بیماران دیابتیک به عنوان یک روش ارزیابی استاندارد برای کنترل وضعیت گلیسمیک پذیرفته شده است (۲۲،۲۳). در مطالعه حاضر دو هفته پس از القاء دیابت هموگلوبین گلیکوزیله به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرد و یک رابطه معنی‌دار خطی و معکوس با غلظت اسپرم در گروه موش‌های دیابتیک نشان داد. با توجه به اینکه

موش‌های دیابتیک تحت تاثیر استرپتوزوتوسین است. اگرچه کاهش غلظت اسپرم در موش‌های دیابتیک ناشی از تاثیر سیستم اندوکرین بر اسپرماتوژنز و تولید اسپرم بوده ولی تغییرات متابولیسمی مهمی در موش‌های دیابتیک در مدت کوتاه نیز نمایان شده و به نظر می‌رسد در طولانی مدت اثر شدیدتری بر بافت بیضه و سیستم تولید مثل خواهد داشت و زمینه را برای پیشرفت و پیچیدگی بیماری فراهم می‌کند.

#### سپاسگزاری

منابع مالی این مطالعه از محل گرانت دکتر مسعود علیرضایی و دکتر علی سوخته‌زاری وابسته به معاونت محترم پژوهشی دانشگاه لرستان فراهم شده است. نویسندگان از خانم کبری چهراری به خاطر همکاری صمیمانه در انجام آزمایشات بیوشیمیایی تشکر می‌کنند.

نشان دادند (شکل ۲). این نکته اختلالات لیپیدی زودهنگام پس از القاء دیابت را نشان می‌دهد که با مطالعات قبلی همخوانی دارد (۱۰، ۱۵). این اختلالات واکنش‌دهنده سلول‌های اپتلیال لوله‌های منی‌ساز در بافت بیضه موش‌های دیابتیک را توجیه می‌کند (شکل ۳).

#### نتیجه‌گیری

هدف از انجام این مطالعه این بود تا در کوتاه مدت اثرات افزایش قند خون و کلسترول تام ناشی از دیابت قندی القاء شده به وسیله استرپتوزوتوسین را بر فاکتورهای مرتبط با تحرک و باروری اسپرم به خصوص بر روی غلظت اسپرم‌ها در ناحیه اپیدیدیم خلفی از موش‌های سوری بررسی کند. نتایج این مطالعه شواهدی را فراهم کرد که بیانگر اختلال در غلظت اسپرم

#### References:

- 1- Tripathi BK, Srivastava AK. *Diabetes mellitus: Complications and therapeutics*. Med Sci Monit 2006; 12(7): 130-47.
- 2- Wandell PE. *Quality of life of patients with diabetes mellitus. An overview of research in primary health care in the Nordic countries*. Scand J Prim Health Care 2005; 23(2): 68-74.
- 3- Chang YC, Chuang LM. *The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication*. Am J Transl Res 2010; 2(3): 316-31.
- 4- Kobayashi T, Matsumoto T, Kamata K. *Mechanisms underlying the chronic pravastatin treatment-induced improvement in the impaired endothelium-dependent aortic relaxation seen in streptozotocin-induced diabetic rats*. Brit J Pharmacol 2000; 131(2): 231-38.
- 5- Rodriguez-Manas L, Angulo J, Peiro C, Llergo JL, Sanchez-Ferrer A, Lopez-Doriga P, et al. *Endothelial dysfunction and metabolic control in streptozotocin-induced diabetic rats*. Brit J Pharmacol 1998; 123(8): 1495-502.
- 6- Szkudelski T. *The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas*. Physiol. Res 2001; 50(6): 536-46.
- 7- Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C, et al. *Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function*. Hum Reprod 2007; 22(7): 1871-77.
- 8- Mangoli E, Talebi AR, Anvari M, Pouretezari M. *Effects of experimentally-induced diabetes on sperm parameters and chromatin quality in mice*. Iran J Reprod Med 2013; 11(1): 53-60.

- 9- Navarro-Casado L, Juncos-Tobarra MA, Chafer-Rudilla M, Iniguez De Onzono LI, Blazquez-Cabrera JA, Miralles-Garcia JM. *Effect of Experimental Diabetes and STZ on Male Fertility Capacity, Study in Rats*. J Androl 2010; 31(6): 584-92.
- 10- Scarano WR, Messias AG, Oliva SU, Klinefelter GR, Kempinas WG. *Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats*. Int J Androl 2006; 29(4): 482-88.
- 11- Cancel AM, Lobdell D, Mendola P, Perreault SD. *Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis*. Hum. Reprod 2000; 15(6): 1322-28.
- 12- Sonmez M, Turk G, Yuce A. *The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats*. Theriogenology 2005; 63(7): 2063-72.
- 13- Sliwa L, Macura B. *Evaluation of cell membrane integrity of spermatozoa by hypoosmotic swelling test-water test in mice after intraperitoneal daidzein administration*. Archives Androl 2005; 51(6): 443-48.
- 14- Agarwal A, Said TM. *Carnitines and male infertility*. Reprod Biomed Online 2004; 8(4): 376-84.
- 15- Alves MG, Martins AD, Rato L, Moreira PI, Socorro S, Oliveira P.F. *Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility*. Biochimica et Biophysica Acta 2013; 1832(5): 626-35.
- 16- Daubresse JC, Meunier JC, Wilmotte J, Luyckx AS, Lefebvre PJ. *Pituitary-testicular axis in diabetic men with and without sexual impotence*. Diabetes Metab 1978; 4(4): 233-37.
- 17- Baccetti B, La Marca A, Piomboni P, Capitani S, Bruni E, Petraglia F, et al. *Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality*. Hum. Reprod 2002; 17(10): 2673-77.
- 18- Ballester J, Munoz MC, Dominguez J, Rigau T, Guinovart JJ, Rodriguez-Gil JE. *Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH- and LH-linked mechanisms*. J Androl 2004; 25(5): 706-19.
- 19- La Vignera S, Calogero AE, Condorelli R, Lanzafame F, Giammusso B, Vicari E. *Andrological characterization of the patient with diabetes mellitus*. Minerva Endocrinol 2009; 34(1):1-9.
- 20- Donner T, Munoz M. *Update on insulin therapy for type 2 diabetes*. J Clin. Endocrinol. Metab 2012; 97(5): 1405-13.
- 21- George GE. *Relationship of glycated haemoglobin (HbA1c) and glucose in streptozotocin-induced wistar rats is determined by Linear regression*. Asian J Medi Sci 2012; 3(3): 1-5.
- 22- George GS, Uwakwe AA, Ibeh GO. *Glycated hemoglobin, glucose and insulin levels in diabetic treated rats*. Canad J Pure App Sci 2013; 7(1): 2223-26.
- 23- Lester E. *The clinical value of glycated hemoglobin and plasma protein*. Ann Clin Biochem 1989; 26(3): 213-19.



## ***Streptozotocin-induced Diabetic Effects on the Sperm Fertility Parameters, Glycated Hemoglobin and Total Cholesterol in Mice***

***Sookhthezari A (PhD)<sup>\*1</sup>, Alirezaei M (PhD)<sup>2</sup>, Kheradmand A (PhD)<sup>3</sup>, Dezfoulian O (PhD)<sup>4</sup>***

*<sup>1,2,3,4</sup> DVM, School of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorram abad, Iran*

**Received:** 13 Oct 2015

**Accepted:** 31 Dec 2015

### ***Abstract***

**Introduction:** The present study aimed to evaluate the effects of type 1 diabetes model induced by streptozotocin (STZ) on the sperm fertility parameters, glycated hemoglobin (HbA1c) and total cholesterol as lipid metabolism indicators.

**Methods:** Induction of diabetes mellitus was achieved through once subcutaneous (SC) injection of 200 mg/kg body weight of STZ in 10 mice, while the control group received 0.25 ml of distilled water in the same method. For diabetic groups, 8 mice were selected among the animals with higher glucose threshold (350 mg/dl) one week after STZ injection. Two weeks after diabetes confirmation, all the mice were sacrificed and whole blood was taken from cardiac puncture, while testes were removed for histopathological study and sperm evaluation. Total sperm motility, progressive movement, hypoosmotic swelling test and sperm concentration were determined by the conventional methods. Moreover, HbA1c and total cholesterol were measured spectrophotometrically.

**Results:** Diabetic animals showed a significant decrease in sperm count ( $P < 0.05$ ), as well as an increase in HbA1c and total cholesterol ( $P < 0.01$ ) compared to the controls. A significant negative linear relationship ( $R^2=0.90$ ,  $P=0.012$ ) was depicted between HbA1c and sperm concentration in the diabetic group. Epithelial vaculization of seminiferous tubules was observed in the diabetic group in comparison with the control group and epididymal ducts indicated increased volume of spermatozoa in the controls when compared to the diabetic rats.

**Conclusion:** As the study findings revealed diabetes was associated with decreased sperm concentration in the cauda epididymis even two weeks after hyperglycemia induction, which can be mentioned as a predictive index for subfertility. Furthermore, Glycated hemoglobin revealed a negative relationship with sperm concentration. Hypercholesterolemia was also shown in early stages of diabetes indicating an impairment in lipids metabolism, which was confirmed by the histology changes.

**Key words:** Cholesterol; Diabetes; Glycated hemoglobin; Sperm; Streptozotocin

#### ***This paper should be cited as:***

Sookhthezari A, Alirezaei M, Kheradmand A, Dezfoulian O. ***Streptozotocin-induced diabetic effects on the sperm fertility parameters, glycated hemoglobin and total cholesterol in mice.*** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2016; 23(10): 980-88.

**\*Corresponding author: Tel: 09161611290, Email: asookhthezary@yahoo.com**