Original Article

بررسی اثرات حفاظتی ویتامین E و سلنیوم بر اسپرماتوژنز موش های صحرایی نر بالغ مقاوم به انسولین

علیرضا ذاکرعباسعلی[۱]، مجتبی کشاورز[۲]، احمد مظفر[۱]، محمد علی تخشید[۳]، محمد حسن مشکی باف[۴*]

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، فارس، ایران
۲- باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، فارس، ایران
۳- مرکز تحقیقات فن آوری تشخیص آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، شیراز، فارس، ایران.
۴- گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۱/۰۶ تاریخ پذیرش مقاله : ۱۳۹۱/۰۹/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: دیابت یک اختلال چندعاملی ازگروه بیماریهای متابولیک است که با افزایش مزمن قندخون مشخص میشود. در این تحقیق، نقش حفاظتی ویتامین E و سلنیت سدیم در پیشگیری از اثرات مضر مقاومت به انسولین (دیابت نوع۲) بر اسپرماتوژنز مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها: موشهای نر بالغ (۱۸۰- ۲۰۰ گرم) از نژاد ویستار به پنج گروه ۷ تایی (گروه کنترل، گروه شم و ۳ گروه تجربی) تقسیم شدند. این موشها به مدت ۱۱۰روز، روزانه فروکتوز۱۰٪ محلول در آب و همچنین mg/kg 200 ویتامین E (از طریق گاواژ)، mg/kg 5/0 سلنیت سدیم (تزریق درون صفاقی) یا هر دو را دریافت داشتند. پس از این مدت، پارامترهای اسپرم ، سطح تستوسترون، LH، تولید روزانه اسپرم (DSP)، هیستوپاتولوژی بیضه و میزان مالون دی آلدهید (MDA) در بیضه مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: شمارش اسپرم ، درصد تحرک و زنده بودن اسپرم و DSP در موشهای مقاوم به انسولین کاهش یافت . کاهش معنی داری در تعداد سلولهای لایدیگ، اسپرماتوگونی، اسپرماتید و اسپرماتوزوئید در بیضهی حیوانات مقاوم به انسولین مشاهده گردید. میزان MDA و تستوسترون نیز در بیضه حیوانات مقاوم به انسولین افزایش نشان داد . دریافت ویتامین E و سلنیت سدیم میزان MDA ، اثرات مضر فروکتوز بر بیضه ، پارامترهای اسپرم و بافت شناسی بیضه را کاهش داد. دریافت همزمان ویتامین E و سلنیت سدیم بیشترین اثر حفاظتی را ایجاد کرد.

نتیجه گیری: این یافته ها نشان می دهد که تجویز ویتامین E و سلنیت سدیم، بیضه موشهای آزمایشگاهی را در مقابل استرس اکسیداتیو القا شده توسط دیابت نوع ۲ محافظت می کند.

کلمات کلیدی: **دیابت نوع ۲، ویتامین E، سلنیت سدیم، اسپرماتوژنز**

مقدمه

بررسی علل و عوامل ایجاد کنندهی ناباروری در مردان و چگونگی جلوگیری از ایجاد ناباروری در یک جامعه، کمک ارزنده به بیمارانی است که از ناباروری رنج میبرند. دیابت ازگروه بیماریهای متابولیک و یک اختلال چندعاملی است که با افزایش مزمن قندخون یا هیپرگلیسمی مشخص میشود و ناشی از اختلال در ترشح انسولین، عملکرد آن و یا هردو مورد است. در این مطالعه، نقش حفاظتی ویتامین E و سلنیت سدیم در پیشگیری از اثرات مضر مقاومت به انسولین (دیابت نوع۲) بر اسپرماتوژنز مورد بررسی قرار گرفت (۱).

درحال حاضر بیش از ۱۷۰میلیون نفر از مردم جهان به بیماری دیابت مبتلا بوده و پیش بینی میشود این رقم در سال ۲۰۲۵ به ۳۰۰ میلیون نفر و درسال ۲۰۳۰ به ۳۶۶ میلیون نفر برسد. مطالعات اپیدمیولوژیک، بر افزایش شیوع جهانی دیابت شیرین اشاره دارند. دیابت نوع یک، به دلیل تخریب اختصاصی سلولهای بتای تولیدکنندهی انسولین در جزایر پانکراس به وسیلهی سلولهای تی اتو ری اکتیو و مواد واسطهای تولید شده بهوسیله این سلولها، در هنگام التهاب جزایر ایجاد میشود. دیابت نوع دو، به دلیل مقاومت بدن نسبت به عملکرد انسولین همراه با اختلال تدریجی درعملکرد سلول های بتا اتفاق می افتدکه به از دست رفتن تدریجی کنترل متابولیک منجر میگردد (۲).

مقاومت به انسولین، اولین مرحله از دیابت نوع ۲ (دیابت غیر وابسته به انسولین:NIDDM) میباشد. مقاومت به انسولین موجب افزایش انسولین سرم، اختلال در متابولیسم گلوکز، هیپرگلیسمی و ایجاد دیابت نوع ۲ میگردد. این فرم از دیابت، با اختلالات زیادی از جمله افزایش فشار خون، افزایش لیپیدهای خون، اختلالات کلیوی و تولید مثلی همراه است. تاکنون مطالعات زیادی در مورد اثر دیابت نوع یک بر روند اسپرماتوژنز در انسان و حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفته است، اما اینگونه مطالعات، در مورد دیابت نوع ۲ به میزان بسیارکمتری انجام شده است. در تنها مطالعهای که در موشهای مقاوم به انسولین انجام شده است، نشان داده شده است که مقاومت به انسولین موجب کاهش تعداد اسپرم،کاهش تحرک اسپرم و کاهش هورمون تستوسترون میگردد، در حالیکه در میزان LH تغییری حاصل نشده است. یکی از مکانیسم هایی که مقاومت به

* نویسنده مسئول: محمد حسن مشکی باف، گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی، فسا، فارس، ایران. تلفن: ۰۹۱۷۱۳۰۲۸۳۷
Email: meshkibaf2000@gmail.com

انسولین از طریق آن میتواند بر اسپرماتوژنز اثر بگذارد، افزایش رادیکالهای آزاد و ایجاد استرس اکسیداتیو است (۱). رادیکالهای آزاد و گونههای فعال اکسیژن(ROS1)، نقش مهمی در کاهش کمیت و کیفیت مایع منی ایفا می کنند و موجب از دست رفتن حیات و تحرک اسپرم میگردند (۲،۳). اثر رادیکالهای آزاد بر اسپرماتوژنز موش های مقاوم به انسولین، هنوز مورد بررسی قرار نگرفته است.

ویتامین E و سلنیوم از جمله ترکیبات آنتی اکسیدانی میباشند. ویتامین E، یک ویتامین محلول در چربی است که در پاکسازی رادیکالهای آزاد نقش دارد (۴). سلنیوم از اجزای آنزیم های آنتی اکسیدان از جمله گلوتاتیون پراکسیداز به شمار میرود که در خنثی سازی رادیکا های آزاد و رفع استرس اکسیداتیو، به ایفای نقش میپردازد. از آنجایی که مقاومت به انسولین از طریق افزایش رادیکالهای آزاد موجب اثر بر اسپرماتوژنز میگردد، به نظر میرسد مصرف ویتامین E و سلنیوم بتواند این اثرات را متوقف کند (۵). با توجه به مطالب عنوان شده، هدف از مطالعه حاضر بررسی نقش حفاظتی ویتامین E و سلنیوم بر آثار مقاومت به انسولین بر اسپرماتوژنز در موشهای آزمایشگاهی میباشد.

مواد و روش ها

حیوانات آزمایشگاهی: در مطالعه تجربی حاضر، از ۳۵ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با وزن ۱۸۰ تا ۲۳۰ گرم استفاده شد . حیوانات در خانه حیوانات جهرم واقع در دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲±۲۲ درجه سانتی گراد نگه داری شدند. این حیوانات به طور تصادفی در ۵ گروه به شرح زیر قرار داده شدند:

گروه کنترل (A): هیچ گونه دارویی دریافت نمیکردند.

گروه شم: هیچ گونه دارویی دریافت نمیکردند و آب آشامیدنی آنها حاوی فروکتوز ۱۰٪ بود. انتخاب دوز با توجه به مطالعه قبلی که در آن به بررسی اثرات فروکتوز بر القا استرس اکسیداتیو عقیمی پرداخته شده بود، میباشد.

گروه تجربی اول: (C1)سلنیت سدیم را به صورت تزریق درون صفاقی دریافت میکردند و آب آشامیدنی آنها حاوی فروکتوز ۱۰٪ بود.

گروه تجربی دوم: (C2) ویتامین E را به صورت گاواژ و سلنیت سدیم را به صورت تزریق درون صفاقی دریافت میکردند و آب آشامیدنی آنها حاوی فروکتوز ۱۰٪ بود.

گروه تجربی سوم: (C3) ویتامین E به صورت گاواژ به آنها خورانده میشد و آب آشامیدنی آنها حاوی فروکتوز ۱۰٪ بود. مواد فوق روزانه در حدود ساعت ۱۱-۱۰ صبح و به مدت ۱۱۰ روز متوالی از طریق گاواژ و تزریق درون صفاقی به حیوان خورانده شد.لازم به ذکر است که در حین انجام این مطالعه، کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات بر اساس قانون حمایت از حیوانات (SPCA) که در سال ۲۰۰۶ در آمریکا به تصویب رسیده، مد نظر قرار گرفته شد.

وزن بدن و نسبت وزن بیضه ها به وزن بدن: وزن موشها در روز اول آزمایش، قبل از گاواژ و تزریق، با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازهگیری و ثبت گردید. در روز آخر آزمایش، موشها مجددا وزن شدند. سپس با بیهوش کردن حیوان، با سرنگ ۵cc به طور مستقیم از قلب آنها خون گیری شد و پس از سانتریفیوژ خون (زمان ۱۰ دقیقه و سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه) سرم آن جدا شده و در دمای °-C20 به صورت فریز نگهداری شد.

درشرایط استریل با ایجاد شکافی در قسمت تحتانی شکم، بیضه های راست و چپ و اپیدیدیم راست آنها خارج گردید. بیضه ها به صورت جداگانه با استفاده از ترازوی سارتوریوس، با دقت ۰۰۰۱/ گرم وزن شدند. برای بررسی اثرات احتمالی دارو بر وزن بیضهها، وزن به دست آمده، بر وزن بدن حیوان تقسیم و عدد حاصل در عدد ۱۰۰ ضرب گردید. بیضه راست، تا زمان شروع کار برای بهدست آوردن میزان تولید روزانه اسپرم و آنزیم مالون دی آلدهید در دمای °-20 c منجمد گردید. بیضهی چپ به منظور مطالعه بافت شناسی، در محلول فیکساتیو بوئن قرار داده شد.

بررسی درصد اسپرماتوزوئیدهای زند یک سانتیمتر از ناحیه انتهایی اپیدیدیم را بلافاصله پس از خارج کردن از بدن، با قیچی استریل برش داده و در محلول ایزوتونیک (۴ میلی لیتر بافر فسفات سالین) قرار داده شد. این بافت توسط دستگاه هموژنایزر، هموژنیزه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای c°37 قرار داده شد. این زمان جهت خروج کامل اسپرمها از مجرا است. اسمیر به کمک رنگ ائوزین-نگروزین و یک قطره از سوسپانسیون اسپرمی تهیه شده در مراحل فوق، آماده گردید. نظر به جذب رنگ توسط سیتوپلاسم سلول‌های مرده، گسترش تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰× مورد بررسی قرار گرفت و درصد اسپرم‌های زنده نسبت به تعداد کل اسپرم‌های موجود درمیدان دید طی ۱۰ مرتبه محاسبه گردید(۴).

بررسی درصد تحرک اسپرم: قطرهای از سوسپانسیون اسپرمی که در مرحله قبل بهدست آمده را بر روی لام گذاشته، و در ادامه به کمک میکروسکوپ نوری دو چشمی ساخت شرکت Labomed آمریکا که مجهز به دوربین میباشد، از ۵ میدان میکروسکوپی با بزرگ نمایی ۴۰× فیلمبرداری شد. با بازبینی این فیلمها در رایانه، حرکت اسپرمها بررسی و میانگین این حرکت به عنوان درصد تحرک ثبت گردید.

بررسی شمارش اسپرم: یک قطره (۱۰ میکرولیتر) از سوسپانسیون اسپرمی که طی مراحل قبل به دست آمده، بر روی لام نئوبار قرار داده شد و تعداد کل اسپرمها، در چهار خانه بزرگ لام (چهار خانه مربوط به شمارش گلبولهای سفید) شمارش شد. سپس میانگین تعداد اسپرمها در یک خانه محاسبه شد. در نهایت، تعداد کل اسپرمهای خارج شده از یک سانتیمتر انتهایی مجرای اپیدیدیم، از فرمول A=BC+D به دست آمد:

A= تعداد کل اسپرمهای خارج شده از یک سانتیمتر مجرای اپیدیدیم

B= تعداد اسپرمهای شمارش شده در ۰/۱ میلی متر مکعب از محلول (ابعاد یک خانه بزرگ عبارتست از ۱ میلی متر طول، ۱ میلی متر عرض و ۰/۱ میلی متر عمق. در نتیجه حجم محلولی که یک خانه بزرگ را پر میکند، برابر ۰/۱ میلیمتر مکعب است.)

C= فاکتور عمق که ۱۰ میلی متر میباشد.

D= فاکتور رقت، که در اینجا ۴۰۰۰ در نظر گرفته میشود، زیرا اسپرمهای موجود، در ۴ سیسی محلول بافر فسفات سالین انتشار یافتند.

بررسی تولید روزانه اسپرم (DSP) پس ازخروج بیضه راست از انجماد و حذف کپسول آن، قطعهای از پارانشیم بیضه توسط دستگاه هموژنایزر درسرعت کم به مدت ۴ دقیقه در ۲ میلی لیتر نرمال سالین هموژن گردید. از مایع حاصل از هموژنیزه شدن بیضه‌ها، رقت ۰/۱ تهیه و یک قطره از

محلول حاصل بر روی لام نئوبار قرار داده شد. تعداد اسپرمها بهوسیله میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۴۰×، شمارش گردید. از آنجاییکه رشد اسپرماتوزوئیدها در موش صحرایی و در حین اسپرماتوژنز، تقریباً ۶/۳ روز به طول میانجامد، بنابراین پس از محاسبهی تعداد کل اسپرماتوزوئیدها، آن را بر عدد ۶/۳ تقسیم کرده تا میزان تولید در یک روز بدست آید (۴).

بررسی میزان آنزیم مالون دی آلدهید در بافت بیضه: آنزیم مالون دی آلدهید، به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتری (مدل unico ساخت آمریکا)، با روش دارپر و هادلی و بر اساس واکنش با تری باربیتوریک اسید، اندازه گیری شد.

قطعه باقی مانده از بافت بیضه، در ۶ سیسی محلول بافر فسفات هموژن قرار داده شد و سپس در دستگاه هموژنایزر با دور کم و به مدت ۴ دقیقه قرار رفت. سپس، لوله حاوی سوسپانسیون حاصل (لوله آزمایش اول)، در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰ و به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. در ادامه، ۵ سیسی از این محلول به لوله دوم منتقل شد و به آن ۲/۵ سیسی محلول تری کلرو استیک اسید اضافه گردید. لولهی آزمایش دوم، به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. لولهی مورد نظر، پس از سرد شدن، مجدداً در دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد و ۲ سیسی از محلول رویی از آن برداشته و وارد لوله آزمایش سوم شد. به لوله سوم،۱ سیسی محلول تری باربیتوریک اسید با غلظت ۶/۷ گرم در لیتر اضافه شده و لوله برای مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش قرار گرفت. پس از سرد شدن لوله، غلظت آنزیم مالون دی آلدهید در طول موج ۵۳۲ نانومتر و به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. غلظت آنزیم فوق به وسیله ضریب جذب کمپلکس مالون دی آلدهید تری باربیتوریک اسید که برابر با ۱۰۵×۱/۵۶ بهصورت نانوگرم در میلیگرم پروتئین است، محاسبه شد.

روش اندازه گیری هورمون تستوسترون و LH: هورمون تستوسترون و LH با استفاده از کیت الایزا (شرکت DRG آلمان) اندازهگیری گردید. در این مرحله، طبق دستورالعمل کیت، نمونهها در چاهکهای مربوطه ریخته شد و پس از اضافه نمودن محلولها، به مدت ۹۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. چاهکها سپس با آب دیونیزه شستشو داده شد و سوبسترای مربوطه به هر چاهک افزوده شد و برای مدت ۲۰ دقیقه انکوبه گردید. واکنش با افزودن محلول متوقف کننده، متوقف و جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازهگیری شد.

بررسی های بافتی بیضه: بیضهی چپ قرار داده شده در فیکساتیو بوئن، از محلول خارج شد و بافت حاصل، با پارافین قالبگیری گردید. سپس با استفاده از میکروتوم، مقاطع با ضخامت ۵ میکرون تهیه و به روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی گردید. لامهای رنگ‌آمیزی شده، با استفاده میکروسکوپ نوری و از لحاظ تعداد سلولهای اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، سرتولی، لایدیگ، اسپرماتید، توسط فردی که از گروه بندی اطلاع ندارد، بررسی گردید. در هر نمونه، ۱۲ لوله اسپرم ساز بابزرگنمایی ۱۰۰× میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. اعداد به دست آمده به صورت میانگین تعداد سلولها در هر لوله بیان گردید.

تجزیه و تحلیل آماری برای تحلیل دادهها از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست دانکن موجود در نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. بر اساس تست دانکن، اگر در هر گروه حداقل یک هدف مشترک وجود داشته باشد، در این حالت اختلاف معنی داری وجود ندارد. مقدار 5/0P> به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد. میانگین و انحراف معیار داده ها نیز محاسبه شدند.

نتایج

وزن بدن و نسبت وزن بیضه ها به وزن بدن: یافته های مربوط به وزن بدن و نسبت وزن بیضه ها به وزن بدن در جدول ۱ نشان داده شده است. با توجه به این یافته ها و مقایسه میانگین وزن بدن و همچنین میانگین تغییرات وزن بیضه های چپ و راست نسبت به وزن بدن چنین استنباط میشود که مقاومت به انسولین، ویتامین E و سلنیت سدیم باعث کاهش وزن در بین گروه های مختلف شده، اما این کاهش اختلاف معنی داری را نشان نمیدهد.

میانگین شمارش اسپرم: مقاومت به انسولین باعث کاهش معنیدار تعداد اسپرمها شده ولی ویتامین E و سلنیت سدیم هر کدام به تنهایی و همچنین توام با یکدیگر توانسته اند باعث افزایش معنی داری در تعداد اسپرمها نسبت به گروه کنترل شوند (جدول ۲).

میانگین درصد اسپرماتوزوئید های زنده، تولید روزانه اسپرم (DSP): مقاومت به انسولین باعث کاهش معنی دار درصد اسپرماتوزئیدهای زنده و DSP شده است. این در صورتی است که ویتامین E و سلنیت سدیم، توام با یکدیگر توانستهاند باعث افزایش معنی دار درصد اسپرماتوزوئیدهای زنده و DSP نسبت به گروه کنترل شوند (جدول ۲). همچنین آنالیز آماری از کاهش معنی دار درصد اسپرمهای زنده نسبت به تعداد کل اسپرمهای موجود در میدان دید حکایت داشت (شکل ۱).

میانگین غلظت بافتی آنزیم مالون دی آلدهید: مقاومت به انسولین باعث افزایش معنی دار غلظت بافتی آنزیم مالون دی آلدهید شده است، در حالی که یک کاهش معنی دار در غلظت آنزیم در گروه فروکتوز توام با ویتامین E و سلنیت سدیم مشاهده میشود (جدول ۲).

میانگین غلظت سرمی هورمون تستوسترون LH، بر اساس اطلاعات جدول شماره ۳، تغییر معنا داری در غلظت سرمی هورمون تستوسترون مشاهده شد. این تغییر در مورد هورمون LH، از نظر آماری معنا دار نیست.

درصد تحرک اسپرم: طبق جدول شماره ۴، مقاومت به انسولین باعث کاهش معنی دار، ولی ویتامین E و سلنیت سدیم توام با یکدیگر باعث افزایش معنی دار درصد تحرک اسپرم نسبت به گروه کنترل شدهاند.

بررسی های بافتی بیضه: با توجه به جدول ۵ مشاهده میشود که مقاومت به انسولین باعث کاهش معنی دار در تعداد سلولهای اسپرماتوگونی، سرتولی و لایدیگ شده ولی ویتامین E و سلنیت سدیم، توام با یکدیگر، باعث افزایش معنی دار در تعداد سلولهای اسپرماتوگونی، سرتولی و سلولهای لایدیگ نسبت به گروه کنترل شدند. همچنین مشاهده شد که مقاومت به انسولین باعث کاهش معنی دار تعداد سلولهای اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و اسپرماتوزوئید شده است، ولی ویتامین E و سلنیت سدیم، به تنهایی و توأم با یکدیگر، تعداد سلولهای اسپرماتوسیت اولیه ، اسپرماتید و اسپرماتوزوئید را نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری افزایش میدهند (شکل ۱).

بحث و نتیجه گیری

با توجه به مطالعات انجام شده بر روی مقاومت به انسولین و افزایش استرس اکسیداتیو (۶) و در پی آن افزایش آنزیم مالون دی آلوهید که فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدی توسط گونه های فعال اکسیژن

(ROS[1]) است (۷)، میتوان به این نتیجه رسید که تولید ROS باعث توقف سیکل سلولی و افزایش فرآیند آپوپتوز میشود که بدین ترتیب باعث کاهش تولید روزانه اسپرم و همچنین کاهش تعداد کلی اسپرم میگردد (۱۰-۸).

با توجه به این مطالعه و این مطلب که مقاومت به انسولین میتواند باعث تولید رادیکال آزاد (ROS) در سلول شود (۱۱)، می توان چنین استدلال کرد که تولید رادیکال آزاد در سلولهای زایای بیضه که بسیار حساس هستند، باعث از بین رفتن آنها و کاهش وزن بیضه میشود؛ به علاوه میتوان گفت یکی از دلایل احتمالی آتروفی شدن بیضهها عوامل ناشناخته است که در جریان اسپرماتوژنز اختلال ایجاد میکنند و در نتیجه با کاهش تعداد سلولهای جنسی، کاهش وزن بیضه ها نیز اتفاق میافتد.

علاوه بر این، در مطالعات دیگر مشخص شد که تولید ROS باعث کاهش کمیت و کیفیت مایع منی شده (۱۱،۱۲) و به واسطه ی افزایش نفوذپذیری سلولی، مرگ اسپرم را رقم میزند (۱۳،۱۴).

طبق مطالعات دیگر مشخص شده که ROS از دو منبع متفاوت در مایع اسپرمی به نام سلول های اسپرماتوزوئید آسیب دیده و گلبولهای سفید فعال تولید میشود، که مقادیر بالای آن با اختلال در ساختار DNA، کاهش درصد اسپرمهای زنده و عدم اتصال اسپرم به سطح تخمک، باعث ناباروری در مردان می‌شود (۱۵،۱۶).

مطالعات کوبایاشی و همکارانش در سال ۲۰۰۱ نشان داد که یک کاهش مستمر در تعداد سلولهای اسپرم زنده و فعال در ارتباط با افزایش مقدار ROS وجود دارد (۱۷). افزایش مقدار آنزیم مالون دی آلدهید و در نتیجه اختلال در نظم و فعالیت غشاء سلولی می شود به طوری که روندهای انتقال یونی و گرادیان غلظتی یونها در دو طرف غشا و همچنین انتقال پیامبرهای شیمیایی نیز مختل میگردد (۱۸،۱۶).

اسپرم نسبت به اکسیژن حاصل از پراکسیداسیون چربی حساس است و این امر موجب تخریب غشا و کاهش باروری آن میگردد (۱۵،۱۹). مطالعات نشان میدهد که گونههای فعال اکسیژن تولید شده توسط لکوسیت و یا اسپرماتوزوئید در مردان عقیم، اثرات مهلکی بر فعالیت اسپرم دارند. پراکسیداسیون چربی موجب ناهنجاری در قطعه میانی اسپرم و از دست دادن ظرفیت آکروزوم در لقاح میگردد (۲۰).

مولکولهای مالون دی آلدهید با نفوذ به ساختار غشای سلول، موجب عدم تقارن در توزیع اجزای لیپیدی غشا می شوند. علاوه بر این، این مولکولها با ایجاد پیوندهای محکم با DNAی سلول، موجب بروز صدمات و شکستگیهایی در کروموزوم میگردند (۱۸). وجود رابطه معکوس بین غلظت MDA و میزان چسبندگی اسپرم به سلول تخمک توسط ایتکن و همکارانش در سال ۱۹۹۲ به اثبات رسید (۲۱). بنابراین وجود ROS و مالون دی آلدهید باعث کاهش کیفیت اسپرم میشود که این حالت با مقاومت به انسولین و ایجاد استرس اکسیداتیو مشاهده میگردد (۱۸،۱۵).

با توجه به این تحقیقات و مطا لعه ایی که توسط colborn و همکاران (۱۲) انجام گردیده، بیان داشته است که مواد شیمیایی اخلالگر سیستم اندوکرین (EDC) با تولید رادیکالهای آزاد (ROS) قادر به اعمال آسیبهای اکسیداتیو به مولکولهای زیستی از قبیل DNA و پروتئین هستند. احتمال میرود با مقاومت به انسولین و ایجاد رادیکال آزاد (ROS) و جهش در بافت بیضه خصوصاً سلولهای حساس اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و اسپرماتوزوئید باعث آسیب جدی و از بین رفتنِ این سلولها شود(۱۱). از طرفی با توجه به اینکه در این پژوهش، احتمالاً مقاومت به انسولین باعث کاهش هورمون تستوسترون این کاهش معنی دار نبوده است) شده و احتمال کاهش سلول های زایا وجود دارد.

به همین دلیل، احتمال آسیب و از بین رفتن سلول های بینابینی و سرتولی از این طریق نیز وجود دارد. همچنین عملکرد سلول های بینابینی تحت تأثیر سلولهای سرتولی نیز قرار میگیرد (۱۰).

ویتامین E یا آلفاتوکوفرول به علت حلالیت در چربی میتواند مانع از اثرات تخریبی ROS بر روی پارامترهای اسپرم شود (۲۰). یک مولکول توکوفرول به عنوان یک آنتی اکسیدان شکننده زنجیره میتواند دو رادیکال پروکسیل لیپید و در نتیجه دو واکنش بالقوه زنجیرهای پراکسیداسیون را مهار کند (۲۲). سلنیوم از اجزای آنزیمهای آنتی اکسیدان از جمله گلوتاتیون پراکسیداز است که در خنثی سازی رادیکالهای آزاد و رفع استرس اکسیداتیو نقش دارد.

تشکر وقدردانی

نویسندگان مقاله مراتب سپاس خود را از پرسنل محترم بخش تحقیقات دانشگاه آزاد واحد جهرم اعلام می دارند.

References

1. John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. The Journal of nutritional biochemistry. 2001;12(9):500-504.
2. Fujii J, Iuchi Y, Matsuki S, Ishii T. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. Asian journal of andrology. 2003;5(3):231-242
3. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical biochemistry. 1979;95(2):351-358
4. Aldana L, Tsutsumi V, Craigmill A, Silveira MI, Gonzalez de Mejia E. alpha-Tocopherol modulates liver toxicity of the pyrethroid cypermethrin. Toxicology letters. 2001;125(1-3-):107-116.
5. Kathleen L, Sylvia E . Krauses food, nutrition &diet therapy, WB Saunders Company: 2000.
6. Toth A. Male infertility due to sulphasalazine. Lancet. 1979;2(8148):904
7. Pascoe GA, Olafsdottir K, Reed DJ. Vitamin E protection against chemical-induced cell injury. I. Maintenance of cellular protein thiols as a cytoprotective mechanism. Archives

1- Reactive Oxygen Species

of biochemistry and biophysics. 1987;256(1):150-158.
8. Kobayashi H, Gil-Guzman E, Mahran AM, Rakesh, Nelson DR, Thomas AJ, Jr., et al. Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay. Journal of andrology. 2001;22(4):568-574.
9. Fukushima T, Hamada Y, Komiyama M, Matsuno Y, Mori C, Horii I. Early changes in sperm motility, acrosome reaction, and gene expression of reproductive organs in rats treated with sulfasalazine. Reprod Toxicol. 2007;23(2):153-157.
10. George FW, Johnson L, Wilson JD. The effect of a 5 alpha-reductase inhibitor on androgen physiology in the immature male rat. Endocrinology. 1989;125(5):2434-2438.
11. Choi SM, Yoo SD, Lee BM. Toxicological characteristics of endocrine-disrupting chemicals: developmental toxicity, carcinogenicity, and mutagenicity. Journal of toxicology and environmental health Part B, Critical reviews. 2004;7(1):1-24.
12. Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. Environmental health perspectives. 1993;101(5):378-384.
13. Fukushima T, Kato M, Adachi T, Hamada Y, Horimoto M, Komiyama M, et al. Effects of sulfasalazine on sperm acrosome reaction and gene expression in the male reproductive organs of rats. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology. 2005;85(1):675-682.
14. Hammerstedt RH. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. Reproduction, fertility, and development. 1993;5(6):675-690.
15. Ravie O, Lake P. The phospholipid-bound fatty acids of fowl and turkey spermatozoa. Animal Reproduction Science. 1985;9(2):189-192.
16. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. Urology. 1996;48(6):835-850.
17. Levi AJ, Fisher AM, Hughes L, Hendry WF. Male infertility due to sulphasalazine. Lancet. 1979;2(8137):276-278.
18. Ernster L. Lipid peroxidation in biological membranes: mechanisms and imp;ications, in: Active oxygen, lipid peroxides and antioxidants. Published by CRC Press, Boca Raton. 1993; 1-38.
19. Wishart GJ. Effects of lipid peroxide formation in fowl semen on sperm motility, ATP content and fertilizing ability. Journal of reproduction and fertility. 1984;71(1):113-118.
20. Aitken RJ, West K, Buckingham D. Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress, and sperm function. Journal of andrology. 1994;15(4):343-352
21. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. Journal of andrology. 1988;9(6):367-376.
22. Wolf R, Wolf D, Ruocco V. Vitamin E: the radical protector. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV. 1998;10(2):103-117.

Original Article

Protective effects of vitamin E and selenium on spermatogenesis in adult male rat insulin-resistant

Zakerabasali A[1], Keshavarz M[2], Mozafar A[1], Takhshid MA[3], Meshkibaf MH[4*]

1- Department of biology, Islamic Azad University, Jahrom, Fars, Iran.
2- Youth Research center, Islamic Azad University, shiraz, Fars, Iran.
3- Laboratory Diagnosis Research Center, Paramedical College, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
4- Department of Biochemistry, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Fars, Iran.

Recieved: 25 Mar 2012 Accepted: 04 Dec 2012

Abstract

Background & Objective: Diabetes mellitus is a metabolic disease and is a multifactorial disorder characterized by chronic hyperglycemia resulting from impaired insulin secretion and insulin factional or both. In this study, the protective role of vitamin E and sodium selenite in preventing the harmful effects of insulin resistance (diabetes type 2) on spermatogenesis was studied.

Materials & Methods: Male adults (180-200 g) of Wistar rats were divided into five groups, each containing 7 rats (control, sham, and three experimental groups). The rats were fed daily with water-soluble fructose (10%), 200 mg/kg of vitamin E (gavage) and 0.5 mg/kg of sodium selenite (intraperitoneal injection) or both for 110 days. Subsequently, sperm parameters, levels of testosterone, LH, and daily sperm production (DSP) were checked. Additionally, testicular histopathology and Malondialdehyde (MDA) in the testis were examined.

Results: Sperm count, sperm motility and viability, and insulin resistance in the rats decreased DSP. A significant decrease was observed in the number of Leydig cells, spermatogonia, spermatogenesis, and spermatozoa in the testis of the insulin-resistant animals, whereas, MDA and testosterone rose in the insulin-resistant rats. Vitamin E and sodium selenite intake reduced the levels of MDA and harmful effects of fructose on testicles, as well as sperm parameters and testicular pathology. A simultaneous intake of vitamin E and sodium selenite conferred the highest level of protection.

Conclusion: These findings suggest that vitamin E and sodium selenite can have a protective role in the testes of rats against oxidative stress induced by diabetes type 2.

Keywords: Type 2 diabetes, Vitamin E, Sodium selenite, Spermatogenesis

*** Corresponding author: Meshkibaf Mohammad Hasan,** Department of Biochemistry, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Fars, Iran.
Tel: +98 917 1302837
Email: meshkibaf2000@gmail.com