

Effects of Colostrum on Sperm Parameters, Sex Hormones and Testes Histopathological Changes in Diabetic Rats

Elham Serki¹,
Khadijeh Vazifeshenas Darmiyan¹,
Samira Ezi²,
Javad Bayat³,
Farhad Shahamat³,
Zahra Ghiravani⁴,
Mehran Hosseini⁵

¹ MSc in Biochemistry, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

² MSc in Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

³ MSc in Exercise Physiology, Faculty of Education and Psychology, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

⁴ Instructor, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

⁵ BSc in Public Health, Research Centre of Experimental Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

(Received April 30, 2016 ; Accepted July 4 , 2016)

Abstract

Background and purpose: Multiple line of evidence suggested that diabetes has adverse effects on male sexual and reproductive functions. The aim of present study was to investigate the protective effect of colostrum (COL) on sperm parameters, sex hormones, testes histopathological changes, and oxidative stress in diabetic rats.

Materials and methods: In this experimental study, 30 diabetic male Wistar rats were randomly divided into three groups (n=10) and were treated either by saline (model) or COL (100-200 mg/kg). Also, 10 healthy age matched rats were allocated as normal control group which received only saline. The rats in the COL treated groups were given colostrum at 100-200mg/kg once a day orally for 8 weeks. At the end of the study, epididymal sperms were counted, and testis tissues and blood samples were collected for histopathologic and biochemical analysis. Data were analyzed using ANOVA, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests in SPSS V.18.

Results: COL treatment (at both doses) significantly decreased the elevated glucose ($P<0.01$) and tissue malonaldehyde (MDA) ($P<0.05$) levels in plasma and testis tissues samples, respectively. The COL treated rats showed an improved histologic appearance (germinal layer thickness, spermatogonia number, seminiferous tubule diameters) and serum testosterone levels.

Conclusion: The results clearly provide evidence that CLO treatment can inhibit the progression of reproductive system complication in diabetic rats.

Keywords: diabetes, colostrum, testes, sperm, testosterone, malonaldehyde, rats

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26 (141): 83-94 (Persian).

بررسی اثرات مصرف آغوز بر پارامترهای اسپرمی، غلظت تستوسترون و تغییرات بافتی بیضه در موش های دیابتی

الهام سرکی^۱

خدیجه وظیفه شناس درمیان^۱

سمیرا ایزی^۲

جواد بیات^۳

فرهاد شهامت^۳

زهره قیروانی^۴

مهران حسینی^۵

چکیده

سابقه و هدف: شواهد متعدد علمی نشان می دهند که اختلال در عملکرد تولید مثلی در جنس نری یکی از عوارض شایع دیابت می باشد. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثرات مصرف آغوز بر پارامترهای اسپرمی، غلظت تستوسترون و تغییرات بافتی بیضه در موش های دیابتی طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش ها: در این پژوهش تجربی، ۳۰ سر موش دیابتیک نر نژاد ویستار به صورت تصادفی به ۳ گروه مساوی (مدل دیابتی، تجربی ۱ و تجربی ۲) تقسیم شدند و یک گروه ده تایی موش سالم همسن نیز به عنوان گروه کنترل سالم در نظر گرفته شد. گروه های تجربی ۱ و ۲ به ترتیب با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/kg پودر لیوفلیزه آغوز (حل شده در نرمال سالین) به صورت خوراکی و به مدت ۸ هفته متوالی تیمار شدند. پارامترهای قندخون، هورمون های جنسی، تعداد و درصد تحرک اسپرم، مالون دی آلدئید و تغییرات بافت شناسی بافت بیضه مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت مقایسه بین گروهی یافته ها از آزمون های آماری ANOVA، Kruskal-Wallis و Mann-Whitney به کمک نرم افزار آماری SPSS و پیرایش ۱۸ استفاده گردید.

یافته ها: آغوز در هر دو غلظت توانست به طور معنی داری افزایش قند خون ($p < 0/01$) و مالون دی آلدئید ($p < 0/05$) بیضه را در مقایسه با گروه مدل دیابتی مهار نماید؛ از کاهش تستوسترون، تعداد و تحرک اسپرم ها، مساحت لوله های اسپرم ساز، تعداد اسپرماتوگونی ها و ضخامت اپیتلیوم زایشی نیز جلوگیری نماید.

استنتاج: یافته های این پژوهش به وضوح نشان می دهند که مصرف مکمل آغوز می تواند پیشرفت عوارض سیستم تولید مثلی موش های صحرایی دیابتی را مهار نماید.

واژه های کلیدی: دیابت، آغوز، بیضه، اسپرم، تستوسترون، مالون دی آلدئید، موش صحرایی

مقدمه

دیابت یکی از شایع ترین بیماری های غیر واگیر و مزمن در سطح جهان است که همزمان با رشد و توسعه کشورها و پدیده شهرنشینی در کنار تغییر سبک زندگی مردم و کاهش فعالیت فیزیکی ابتلا به آن روز به روز در

E-mail: mehranhosseiny@yahoo.co.in

مؤلف مسئول: مهران حسینی - بیرجند: معاونت تحقیقات و فناوری، مرکز تحقیقات طب جنوبی

۱. کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

۲. کارشناس علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

۳. کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، سیستان و بلوچستان، ایران

۴. مربی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

۵. کارشناس بهداشت عمومی، مرکز تحقیقات طب تجربی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۲/۱۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۴/۱۴

حال افزایش است. در سال ۲۰۱۱ انجمن جهانی دیابت شمار مبتلایان به این بیماری را ۳۶۶ میلیون نفر برآورد کرده است که پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۳۰ این تعداد به عدد ۵۵۲ میلیون نفر نیز برسد. این انجمن آمار مبتلایان به دیابت در کشور ایران در سال ۲۰۱۱ را ۴/۶۹۵/۰۰۰ نفر برآورد نموده که پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۳۰ شمار این مبتلایان به حدود دو برابر یعنی ۸/۳۸۴/۰۰۰ نفر برسد (۱). بیش از آن چه دیابت به دلیل افزایش قند خون دارای اهمیت باشد، بروز عوارض خطرناک ناشی از دیابت در مبتلایان به این بیماری سبب اهمیت آن شده است. بررسی‌های علمی نشان می‌دهند که دیابت با بروز عوارض متعدد متابولیکی مانند هایپر لیپیدمی، عوارض کلیوی و هم‌چنین عوارض عصبی همراه بوده و از آن‌جائی که اسپرما توژنز روندی است که شدیداً از متابولیسم گلوکز تأثیر می‌پذیرد، از این‌رو در افراد دیابتی، کاهش توان باروری به خصوص در جنس مذکر مشاهده می‌شود (۲). مطالعات انسانی و هم‌چنین پژوهش بر روی مدل‌های حیوانی نشان داده‌اند که دیابت می‌تواند با داشتن اثرات سوء بر روی پارامترهای اسپرم (تعداد و کیفیت)، آسیب DNA و کروماتین، اختلال در نعوظ، آسیب بر سلول‌های زایای اسپرم در بافت بیضه و هورمون‌های جنسی، سبب کاهش توان باروری و یا ناباروری در جنس مذکر گردد (۳، ۴).

کلستروم یا آغوز یک ماده مغذی است که پیش از ترشح شیر و بلافاصله پس از تولد توسط غدد پستانی جنس ماده در پستانداران ترشح می‌شود. آغوز نسبت به شیر معمولی مادر دارای چربی کم‌تر و پروتئین بیش‌تر می‌باشد. خواص و فواید زیادی برای آغوز بر شمرده شده است و از دوران‌های بسیار قبل نیز مصرف آن توصیه می‌شده است (۵). اخیراً از کلستروم به عنوان ماده‌ای با خواص تنظیم‌کننده سیستم ایمنی، آنتی‌باکتریال، ضد التهاب در بیماری روماتوئید آرتریت و هم‌چنین به عنوان یکی از ترکیبات مورد استفاده در تهیه واکسن‌ها استفاده می‌شود. از آن‌جایی که آغوز یک ترکیب طبیعی و متعادل

حاوی ویتامین‌های نظیر E، C، A و هم‌چنین مواد معدنی و آمینو اسیدهای متنوع می‌باشد، به عنوان یک ترکیب دارای خواص آنتی‌اکسیدان نیز مطرح می‌باشد (۶). امروزه آغوز نه تنها برای نوزادان بلکه برای سالمندان نیز به عنوان یک مکمل طبیعی و مفید توصیه می‌شود. آغوز گاو همانند آغوز انسانی دارای ترکیبات زیستی فعال متعدد می‌باشد و تحقیقات نشان داده‌اند که فاکتورهای ایمنی موجود در آغوز گاو به مراتب بیش‌تر از آغوز انسان می‌باشند (۷). مطالعات گذشته نشان داده‌اند که مصرف خوراکی آغوز در موش‌های دیابتی سبب کاهش قندخون در آن‌ها می‌شود (۹، ۸). تاکنون بیش‌تر مطالعاتی که اثرات زیستی آغوز را مورد سنجش قرار داده‌اند، معطوف بر سیستم ایمنی و شاخص‌های آن بوده‌اند و مطالعات اندکی در رابطه با اثرات آن بر بیماری‌های متابولیکی نظیر دیابت صورت گرفته است. با این حال در برخی پژوهش‌های انسانی مشخص شده است که مصرف خوراکی آغوز می‌تواند قند خون را در بیماران دیابتی تعدیل و هم‌چنین اثرات سودمندی بر چربی‌های خون داشته باشد (۱۰). با تمام محاسنی که برای مصرف آغوز ارائه شده است، تاکنون اثرات آن بر سیستم تولید مثلی جنس مذکر، چه در بیماران دیابتی و یا مدل‌های حیوانی دیابت، مورد سنجش قرار نگرفته است، لذا این پژوهش به منظور ارزیابی اثرات احتمالی مصرف خوراکی مکمل آغوز بر عملکرد جنسی موش‌های صحرایی نر دیابتی شده با استرپتوزوتوسین طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، از رت‌های نر نژاد ویستار با دامنه وزنی ۱۸۰-۲۰۰ گرم استفاده گردید. حیوانات به مدت یک هفته بدون انجام هیچ گونه مداخله‌ای جهت سازگار شدن با محیط آزمایشگاه در شرایط استاندارد (سیکل روشنایی/ تاریکی ۱۲ ساعته، دسترسی آزاد به غذای حیوانات و آب شهری سالم و دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد) در قفس‌هایی از جنس پلی‌اتیلن نگهداری

شدند. روش کار با حیوانات در این طرح مطابق شرح پیش رو بر اساس چک لیست رعایت اخلاق در کار با حیوانات آزمایشگاهی ابلاغی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی با تاکید بر استفاده از حداقل حیوان مورد نیاز و به حداقل رساندن آزار و درد در مراحل مختلف اجرای مطالعه، طراحی و اجرا گردید. آغوز از گاوهای نژاد هلستین در فاصله کم تر از ۶ ساعت پس از زایمان به دست آمد و بلافاصله به ظرف های استریل منتقل و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد فریز گردید. نمونه های فریز شده با استفاده از دستگاه فریز درایر (شرکت دنا-ایران) به پودر تبدیل شدند. بازدهی این روش ۲۵ درصد بود. پودر لیوفیلیزه حاصل تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

جهت ایجاد دیابت نوع یک از ماده استرپتوزوتوسین (شرکت سیگما آلد ریچ- امریکا) استفاده شد. بدین منظور موش های ناشتا مورد تزریق درون صفاقی محلول استرپتوزوتوسین (حل شده در آب مقطر) با دوز ۵۰ mg/kg قرار گرفتند. ۷۲ ساعت پس از تزریق، قندخون ناشتای موش ها توسط دستگاه قندخون جیبی (ACCU CHECK, Germany) و از طریق جراحی دمی مورد سنجش قرار گرفت. قند خون ناشتای مساوی یا بیش تر از ۳۵۰ mg/dL به عنوان دیابتیک پذیرفته شد (۱۱). سپس موش های دیابتیک به صورت تصادفی به سه گروه مساوی تقسیم شدند (n=10). پس از گذشت یک هفته، حیوانات به شرح پیش رو تقسیم شدند و مورد تیمار قرار گرفتند:

- ۱- کنترل سالم (CON): موش های سالم دریافت کننده روزانه ۱/۵ میلی لیتر نرمال سالین.
- ۲- مدل دیابتیک (MOD): موش های دیابتی دریافت کننده روزانه ۱/۵ میلی لیتر نرمال سالین.
- ۳- آغوز ۱۰۰ mg/kg (CL۱۰۰): موش های دیابتی دریافت کننده روزانه ۱۰۰ mg/kg مکمل آغوز
- ۴- آغوز ۲۰۰ mg/kg (CL۲۰۰): موش های دیابتی دریافت کننده روزانه ۲۰۰ mg/kg مکمل آغوز.

گروه ها به مدت ۸ هفته به صورت خوراکی (گاواژ) و روزانه یک مرتبه با مداخلات فوق الذکر تیمار شدند.

دوزهای آغوز بر اساس مطالعه قبلی که اثرات کاهنده قند خون را مشاهده کرده بودند، انتخاب شد (۹). پس از گذشت ۸ هفته تیمار پیوسته، حیوانات در شرایط ناشتا پس از توزین مورد بیهوشی عمیق با تزریق کتامین: زایلازین (۸۰:۱۰ mg/kg) قرار گرفتند. سپس بلافاصله خونگیری قلبی از موش ها انجام شد و بیضه راست هر یک از موش ها توزین و جهت انجام پروسه بافت شناسی در محلول فیکساتیو بوئن قرار داده شد. بیضه چپ موش ها جهت اندازه گیری غلظت مالون دی آلدئید بافتی به تانک ازت انتقال داده شد و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. اپیدیدیم بیضه چپ جهت اندازه گیری غلظت و تحرک اسپرم ها جدا شد.

بررسی شمارش و تحرک اسپرم

اپیدیدیم چپ پس از جدا شدن بلافاصله درون پتری دیش حاوی ۴ میلی لیتر آلبومین سرم گاوی و یک میلی لیتر محیط HTF (سیگما، آمریکا) که قبلاً درون انکوباتور قرار گرفته بود، منتقل شده و دم اپیدیدیم به وسیله یک قیچی تیز و استریل قطعه قطعه گردید تا اسپرم ها بتوانند وارد محیط شوند. سپس پتری دیش درون انکوباتور CO2 به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت (۵ درصد CO2, ۳۷°C). به منظور شمارش اسپرم ها، ۱۰ میکرولیتر از محلول درون پتری با ۱۹۰ میکرولیتر نرمال سالین رقیق شد و سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق شده به لام هموسیستمتر که لامل سنگی بر روی قرار داده شده بود، منتقل گردید و شمارش اسپرم با بزرگ نمای ۱۰۰ برابر صورت پذیرفت. به منظور بررسی تحرک اسپرم ها، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اولیه برداشته شده و بر روی لام هموسیستمتر قرار گرفت و اسپرم های متحرک مورد شمارش قرار گرفت.

اندازه گیری هورمون های جنسی

سنجش غلظت پلاسمایی هورمون های تستوسترون و LH به روش الایزا و استفاده از کیت (IBL, (Flughafenstrasse, 52a, Hamburg D-22335, Germany انجام شد.

بررسی مالون دی آلدئید بافت بیضه

قطعه باقی مانده بافت بیضه (نگهداری شده در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد) در ۶ میلی لیتر محلول بافر فسفات قرار داده شد و توسط دستگاه هموژنایزر به مدت ۴ دقیقه هموژن گردید. سپس لوله حاوی سوسپانسیون به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. ۵ میلی لیتر از محلول برداشته شد و به لوله دوم که حاوی ۲/۵ میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید بود، اضافه گردید. سپس لوله به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد و سپس به سرعت در ظرف یخ انکوبه شد. سپس غلظت مالون دی آلدئید توسط دستگاه اسپکتوفتومتر با طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه گیری شد. غلظت مالون دی آلدئید به وسیله ضریب جذب کمپلکس مالون دی آلدئید تری باریتوریک اسید که برابر با 1.05×10^{-5} به صورت نانوگرم در میلی گرم پروتئین محاسبه گردید (۱۲).

بررسی بافت شناسی بیضه

از نمونه فیکس شده بیضه به روش معمول بافت شناسی مقاطع بافتی تهیه و با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی گردید. جهت ارزیابی تغییرات بافتی از هر موش سه لام (۹ مقطع) و از هر لام ۱۰ فیلد میکروسکوپی و در هر فیلد بین ۴ الی ۱۰ لوله اسپرم ساز (حداقل ۹۰۰ لوله اسپرم ساز برای هر گروه) با درشت نمایی های ۱۰۰ برابر (جهت اندازه گیری مساحت ها) و ۴۰۰ برابر (شمارش اسپرماتوگونی ها) به وسیله میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) مشاهده و تصاویر توسط دوربین دیجیتال (BX51, Japan) کالبره شده توسط لام هموسیستمتر متصل به میکروسکوپ تهیه

گردید. تصاویر تهیه شده توسط نرم افزار آنالیز تصاویر میکروسکوپی (Image J 1.44p; National institute of Health, USA) مورد اندازه گیری کمی قرار گرفتند. تعداد اسپرماتوگونی ها، ضخامت اپیتلیوم زایشی و مساحت کل لوله های اسپرم ساز برای تمام مقاطع اندازه گیری گردید. نتایج توصیفی به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار آورده شده است. از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) نیز برای تعیین نرمال بودن توزیع داده ها استفاده شد. جهت مقایسه متغیرهای دارای توزیع نرمال در بین گروه ها از آزمون آماری ANOVA و تست تعقیبی Tukey و جهت مقایسه درجات هیستوپاتولوژیک (مساحت لوله های اسپرم ساز و مساحت اپیتلیوم زایشی) بین گروه های مورد مطالعه از آزمون ناپارمتری Kruskal-Wallis H test و در صورت معنی دار بودن آزمون مذکور از تست ناپارمتری Mann-Whitney U test با اصلاح بونفرونی (Bonferroni Correction) و مقایسات زوجی (برای کنترل خطای نوع اول) استفاده شد. اختلافات در سطح ۰/۰۵ معنی دار تلقی شدند. جهت انجام آزمون های آماری فوق الذکر از نرم افزار آماری SPSS ویرایش ۱۸ استفاده گردید.

یافته ها

جزئیات مقادیر و نتایج مقایسه پارامترهای قند خون، وزن موش و وزن بیضه در گروه های مورد مطالعه در جدول شماره ۱ ارائه شده است. همان طور که مشاهده می شود، موش های گروه MOD قندخون بالاتری در مقایسه با گروه های CON ($p < 0.0001$)، CL۱۰۰ ($p = 0.006$) و CL۲۰۰ ($p < 0.0001$) داشتند. میانگین قندخون گروه CL۱۰۰، اگرچه در مقایسه با گروه مدل دیابتیک به طور معنی داری کم تر بود، اما مقایسه آن با گروه کنترل سالم نشان داد که هم چنان به طور معنی داری قند خون بالاتری در قیاس با این گروه دارد. در حالی که مقایسه قندخون موش های

دریافت کننده CL₂₀₀ با گروه کنترل سالم اختلاف معنی داری نداشت ($p=0/78$). به عبارتی آغوز در دوز بالا توانسته بود افزایش قند خون را در موش های دیابتی مهار و آن را به مقدار طبیعی بازگرداند.

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین پارامترهای وزن موش، وزن بیضه و قند خون ناشتا در بین گروه های مورد مطالعه پس از هشت هفته تیمار

گروه	پارامتر	وزن بدن (g)	وزن بیضه (g)	قند خون ناشتا (mg/dL)
CON		۲۴۴/۶۳ ± ۱۹/۸۷ #	۱/۶۶ ± ۰/۱۹ #	۱۰۳/۱۴ ± ۳/۱۸ #
MOD		۱۳۸/۶۳ ± ۲۳/۴۷*	۰/۹۹ ± ۰/۶۴ *	۴۰۷/۳۳ ± ۵۲/۴۹*
CL ₁₀₀		۲۳۳/۷۵ ± ۲۱/۲۵ #	۱/۴۶ ± ۰/۱۲ #	۱۵۷/۴۰ ± ۲۳/۱۴*
CL ₂₀₀		۲۳۲/۲۵ ± ۱۸/۷۸ #	۱/۵۶ ± ۰/۸۴ #	۱۰۹/۳۸ ± ۹/۶۸ #

آنالیز آماری مورد استفاده، تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی می باشد. مقادیر به صورت انحراف معیار ± میانگین برای ۱۰ سر موش صحرایی برای هر گروه ارائه شده است.

CON: گروه کنترل سالم؛

MOD: گروه مدل دیابتی؛

CL₁₀₀: موش های دیابتی دریافت کننده دوز ۱۰۰mg/kg آغوز؛

CL₂₀₀: موش های دیابتی دریافت کننده دوز ۲۰۰mg/kg آغوز

* تفاوت معنی دار ($p \leq 0/05$) در مقایسه با گروه کنترل،

تفاوت معنی دار ($p \leq 0/05$) در مقایسه با گروه مدل دیابتی

مقایسه میانگین وزن موش ها در بین گروه های مورد

مطالعه نشان داد که موش های گروه MOD در پایان مطالعه به طور معنی داری وزن کمتری در مقایسه با گروه CON داشتند ($p=0/01$). در حالی که مقایسه وزن موش های CL₁₀₀ ($p=0/48$) و CL₂₀₀ ($p=0/86$) با گروه CON اختلاف معنی داری نداشت. مقایسه وزن بیضه ها در گروه های مختلف نشان داد که موش های گروه MOD به طور معنی داری وزن بیضه کمتری در مقایسه با موش های سالم داشتند ($p < 0/0001$). تیمار موش های دیابتیک با مکمل آغوز در هر دو دوز توانسته بود کاهش وزن بیضه ها را در موش های دیابتی مهار نماید و هر دو گروه در مقایسه با گروه مدل دیابتی به طور معنی داری وزن بیضه بالاتری داشتند ($p < 0/0001$)، ولی گروه ۲۰۰ CL اختلاف معنی داری با گروه کنترل سالم نداشت ($p=0/99$) و موش های CL₁₀₀ علی رغم این که وزن بیضه بیش تری در مقایسه با گروه MOD داشتند، اما

هم چنان وزن بیضه ها در این گروه به طور معنی داری کم تر از گروه CON بود ($p=0/04$). مقایسه مقادیر غلظت پلاسمایی هورمون های جنسی تستوسترون و LH و هم چنین میزان پارامتر MDA بافت بیضه در جدول شماره ۲ ارائه شده است. همان طور که مشاهده می شود، موش های گروه MOD در پایان مطالعه به طور معنی داری سطح تستوسترون ($p < 0/0001$) و LH ($p=0/002$) کم تری در مقایسه با گروه CON داشتند. سطح MDA بافت بیضه در موش های گروه MOD به طور معنی داری در مقایسه با گروه CON ($p < 0/0001$) بیش تر بود. تیمار موش های دیابتیک با مکمل آغوز به طور معنی داری توانسته بود در هر دو گروه CL₁₀₀ ($p=0/03$) و CL₂₀₀ ($p=0/0001$) مقادیر MDA را در مقایسه با گروه مدل دیابتیک کاهش دهد و مقایسه غلظت MDA در گروه های دریافت کننده مکمل آغوز با گروه کنترل سالم اختلاف معنی داری را نشان نداد (هر دو، $p > 0/05$).

جدول شماره ۲: مقایسه میانگین غلظت های پلاسمایی هورمون های جنسی و غلظت بافتی آنزیم مالون آلدئید (MDA) بیضه در بین گروه های مورد مطالعه پس از هشت هفته تیمار

گروه	پارامتر	LH (mIU/mL)	Testosterone (ng/mL)	MDA (nmol/g tissue)
CON		۴/۴۳ ± ۰/۵۱ #	۲/۶۳ ± ۰/۲۱ #	۱۵/۲۴ ± ۲/۳۹ #
MOD		۱/۹۰ ± ۰/۳۳ *	۲/۲۸ ± ۰/۱۴ *	۲۳/۴۴ ± ۳/۶۱*
CL ₁₀₀		۳/۱۵ ± ۰/۵۲ #	۲/۵۹ ± ۰/۲۲ #	۱۵/۴۷ ± ۲/۶۵ #
CL ₂₀₀		۳/۸۹ ± ۰/۸۱ #	۲/۴۶ ± ۰/۳۴ #	۱۳/۸۱ ± ۲/۸۹#

آنالیز آماری مورد استفاده، تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی می باشد. مقادیر به صورت انحراف معیار ± میانگین برای ۱۰ سر موش صحرایی برای هر گروه ارائه شده است.

CON: گروه کنترل سالم؛

MOD: گروه مدل دیابتی؛

CL₁₀₀: موش های دیابتی دریافت کننده دوز ۱۰۰mg/kg آغوز؛

CL₂₀₀: موش های دیابتی دریافت کننده دوز ۲۰۰mg/kg آغوز

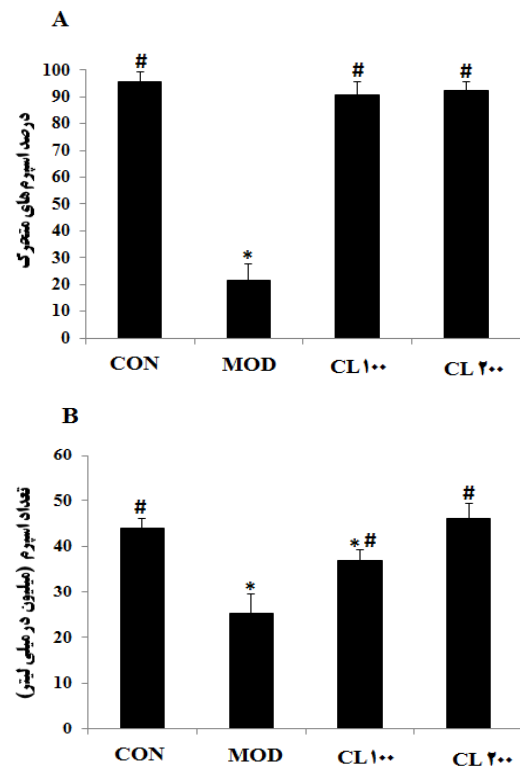
* تفاوت معنی دار ($p \leq 0/05$) در مقایسه با گروه کنترل،

تفاوت معنی دار ($p \leq 0/05$) در مقایسه با گروه مدل دیابتی

اندازه گیری غلظت اسپرم اپیدیدیم و هم چنین درصد تحرک اسپرم ها نشان داد که در گروه مدل

بررسی‌های بافت شناسی نمونه‌های بیضه در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد که تفاوت چشمگیری بین گروه‌های مختلف وجود دارد (تصویر شماره ۱). موش‌های گروه مدل دیابتیک به‌طور معنی‌داری تعداد اسپرماتوگونی ($p < 0/0001$)، مساحت لوله‌های اسپرم‌ساز ($p < 0/0001$) و هم‌چنین ضخامت اپیتلیوم زایشی ($p < 0/0001$) کم‌تری در مقایسه با گروه کنترل سالم داشتند (جدول شماره ۳). تیمار موش‌های دیابتی با مکمل آغوز با دوز 100 mg/kg ($p = 0/01$) و دوز 200 mg/kg ($p < 0/0001$) توانسته بود به‌طور معنی‌داری از کاهش تعداد اسپرماتوگونی‌ها در مقایسه با گروه مدل دیابتیک جلوگیری نماید. مقایسه تعداد اسپرماتوگونی‌ها در هر دو این گروه‌ها با گروه کنترل سالم اختلاف معنی‌داری را در تعداد اسپرماتوگونی‌ها نشان نداد (هر دو، $p > 0/05$). تیمار موش‌های دیابتی با مکمل آغوز توانسته بود کاهش مساحت لوله‌های اسپرم‌ساز را در گروه‌های CL_{100} ($p < 0/0001$) و CL_{200} ($p < 0/0001$) در مقایسه با گروه مدل دیابتیک مهار نماید، اما مساحت لوله‌های اسپرم‌ساز فقط در گروه CL_{200} اختلاف معنی‌داری را با گروه کنترل سالم نشان نداد ($p = 0/81$). موش‌های گروه CL_{200} اگرچه لوله‌های اسپرم‌ساز بزرگ‌تری در مقایسه با گروه مدل دیابتیک داشت، اما مقایسه آن با گروه کنترل سالم هم‌چنان معنی‌دار بود ($p = 0/02$). مصرف مکمل آغوز در اثری وابسته به دوز توانسته بود کاهش ضخامت اپیتلیوم زایشی را در موش‌های دیابتیک مهار نماید، به‌صورتی که ضخامت لایه اپیتلیوم زایشی در گروه‌های CL_{100} آغوز ($p = 0/001$) و CL_{200} ($p < 0/0001$) به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه مدل دیابتیک بود. اما مانند سایر پارامترهای پاتولوژیک، ضخامت اپیتلیوم زایشی تنها در گروه دریافت‌کننده دوز بالای آغوز اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل سالم نداشت ($p = 0/41$).

دیابتیک به‌طور معنی‌داری تعداد اسپرم ($p < 0/0001$) و تحرک اسپرم‌ها ($p < 0/0001$) کم‌تر از گروه کنترل سالم می‌باشد (نمودار شماره ۱). تعداد اسپرم در گروه CL_{200} ($p < 0/0001$) و هم‌چنین CL_{100} ($p < 0/0001$) به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه مدل دیابتیک بود، اما هم‌چنان تعداد اسپرم در گروه CL_{100} به‌طور معنی‌داری ($p = 0/04$) با گروه کنترل سالم اختلاف داشت و کم‌تر بود، اما گروه CL_{200} تفاوت معنی‌داری را با گروه کنترل سالم نداشت ($p = 0/99$). درصد اسپرم‌های متحرک در گروه‌های CL_{100} ($p = 0/46$) و CL_{200} ($p = 0/73$) تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل سالم نداشت.



نمودار شماره ۱: مقایسه میانگین درصد تحرک اسپرم (A) و تعداد اسپرم (B) در گروه‌های مورد مطالعه پس از هشت هفته تیمار مقادیر به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین برای ۱۰ سر موش صحرایی برای هر گروه ارائه شده است.

CON: گروه کنترل سالم؛ MOD: گروه مدل دیابتی؛ CL_{100} : موش‌های دیابتی دریافت‌کننده دوز 100 mg/kg آغوز؛ CL_{200} : موش‌های دیابتی دریافت‌کننده دوز 200 mg/kg آغوز.
* تفاوت معنی‌دار ($p \leq 0/05$) در مقایسه با گروه کنترل،
تفاوت معنی‌دار ($p \leq 0/05$) در مقایسه با گروه مدل دیابتی

جدول شماره ۳: مقایسه میانگین تغییرات کمی بافت بیضه در بین گروه های مورد مطالعه پس از هشت هفته تیمار

پارامتر	تعداد اسپرماتوگونی	مساحت لوله های اسپرم ساز (μm^2)	مساحت اپیتلیوم زایشی (μm^2)
CON	$35/25 \pm 6/48$	$61991/36 \pm 1161/67$	$47557/11 \pm 5506/56$
MOD	$20/33 \pm 9/60^*$	$22669/59 \pm 3557/33^*$	$9266/52 \pm 2062/51^*$
CL100	$34/39 \pm 6/32$	$51592/24 \pm 3834/88^{*}\#$	$41633/40 \pm 5817/51^{*}\#$
CL200	$36/85 \pm 7/48$	$61293/73 \pm 1321/59$	$49273/49 \pm 4729/96$

آزمون آماری مورد استفاده، آزمون ناپارامتری کروسکال-والیس و آزمون تعقیبی من-ویتنی با اصلاح بونفرونی جهت متغیرهای مساحت لوله های اسپرم ساز و مساحت اپیتلیوم زایشی می باشد. مقادیر به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین برای ۱۰ سر موش صحرایی برای هر گروه ارائه شده است.

CON: گروه کنترل سالم؛ MOD: گروه مدل دیابتی؛

CL100: موش های دیابتی دریافت کننده دوز ۱۰۰ mg/kg آغوز؛

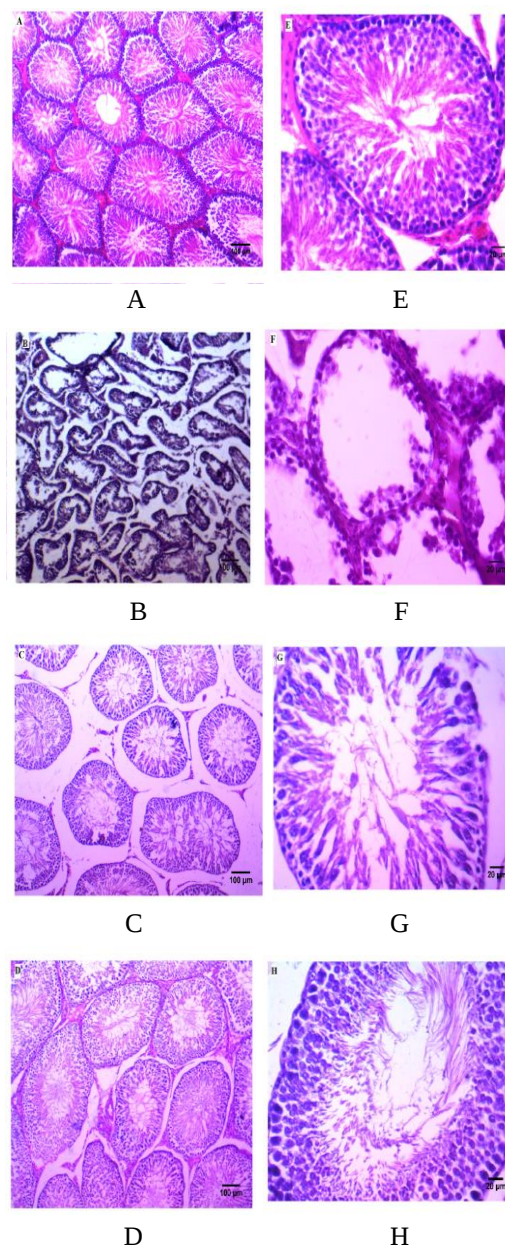
CL200: موش های دیابتی دریافت کننده دوز ۲۰۰ mg/kg آغوز.

* تفاوت معنی دار ($p \leq 0/05$) در مقایسه با گروه کنترل،

تفاوت معنی دار ($p \leq 0/05$) در مقایسه با گروه مدل دیابتی

بحث

در این پژوهش به منظور ارزیابی اثرات مصرف خوراکی مکمل آغوز بر عملکرد جنسی موش های صحرایی نر دیابتی شده با استرپتوزوتوسین، موش های دیابتی به مدت دو ماه با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ (mg/kg) آغوز یک بار در روز و به صورت خوراکی تیمار شدند. در پایان مطالعه نتایج نشان داد که مصرف آغوز توانست اثرات سودمندی در تعدیل آسیب های سیستم تولید مثل ناشی از دیابت داشته باشد. به این صورت که آغوز در اثری وابسته به دوز توانست کاهش پارامترهای تستوسترون، LH، وزن بدن، وزن بیضه، غلظت و درصد تحرک اسپرم را بهبود بخشد و هم چنین قندخون و MDA بافت بیضه موش های دیابتی را به طور معنی داری کاهش داد. مطالعات بافت شناسی نمونه های بیضه موش های دیابتیک نیز نشان داد که مصرف آغوز توانسته بود به طور موثری از کاهش ضخامت اپیتلیوم زایشی جلوگیری نماید و اندازه لوله های اسپرم ساز در گروه های دریافت کننده آغوز به طور معنی داری بزرگ تر از گروه مدل دیابتیک بود.



تصویر شماره ۱: نمای ریزی از بافت بیضه [بزرگ نمایی ۱۰۰X

(سمت چپ) و بزرگ نمایی ۴۰۰X (سمت راست)]

(A,E) نمونه بافت بیضه گروه نرمال، اسپرماتوژنز کامل قابل مشاهده می باشد؛

(B,F) نمونه بافت بیضه گروه مدل دیابتیک، کوچک شدن لوله های اسپرم ساز و از بین رفتن لایه ژرمینال به وضوح قابل مشاهده است؛ (C,G) گروه دریافت کننده دوز ۱۰۰ mg/kg آغوز (CL100)، اندازه لوله های اسپرم ساز طبیعی است اما تعداد اسپرماتوگونی ها و ضخامت لایه ژرمینال هم چنان کم تر از گروه نرمال می باشد؛

(D,H) گروه دریافت کننده دوز ۲۰۰ mg/kg آغوز (CL200)، بافت طبیعی بیضه که با گروه کنترل تفاوتی ندارد.

در این مطالعه از استرپتوزوتوسین جهت دیابتی کردن موش ها استفاده گردید. مطالعات مشابه متعددی نشان داده اند که این ترکیب با آسیب به سلول های بتا جزایر لانگرهانس پانکراس سبب می شود تا ترشح انسولین دچار کاهش شدید شده و در نتیجه دیابت نوع ۱ القا گردد (۱۴، ۱۳). در مدل های دیابت ایجاد شده توسط استرپتوزوتوسین، آسیب به سیستم تولید مثلی جنس نر با افزایش اثر فعالیت های استرس اکسیداتیو به بافت بیضه و اپیدیدیم مشاهده می شود و مطالعات نشان داده اند این آسیب ها چه در فاز اولیه (هفته نخست) ایجاد دیابت چه در فاز پیشرفته آن (هفته ششم) مشاهده خواهند شد (۱۵). مطالعات متعدد بر روی مدل های حیوانی ایجاد دیابت نشان می دهند که دیابت در حیوانات سبب کاهش وزن بدن، وزن ارگان های جنسی، تعداد اسپرم اپیدیدیم و تحرک اسپرم ها می شود (۱۶-۱۸). علاوه بر این موارد، کاهش غلظت پلاسمایی تستوسترون و LH نیز در موش های دیابتی گزارش شده است (۱۹). مطالعات بافت شناسی بیضه در موش های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین نیز نشان داده اند که در مدل حیوانی دیابت لوله های اسپرم ساز کوچک شده و ضخامت اپیتلیوم زایشی کاهش می یابد (۱۹، ۱۸). استرس اکسیداتیو به عنوان عامل اصلی ایجاد عوارض دیابت معرفی شده است (۲۰). از این رو افزایش توان آنتی اکسیدانی بدن و یا کاهش فعالیت های استرس اکسیداتیو به عنوان استراتژی های کنترل دیابت و عوارض آن مطرح می باشند (۲۱). گزارشات علمی نشان می دهند که در مایه انزالی ۴۰-۲۵ درصد مردان نابارور، مقادیر بالای رادیکال های آزاد که عامل اصلی آسیب استرس اکسیداتیو می باشند، یافت شده است و این نکته از این نظر حائز اهمیت می باشد که اسپرم به دلیل این که در غشای پلاسمایی آن اسیدهای چرب بلند زنجیر فراوانی وجود دارد، مستعد واکنش با رادیکال های آزاد بوده و در نتیجه مقادیر اندک رادیکال های آزاد نیز سبب بروز اختلال در تکامل و یا عملکرد اسپرم خواهند شد (۲۲). نکته مهم دیگری که در

خصوص ایجاد آسیب های استرس اکسیداتیو دارای اهمیت می باشد این است که رادیکال های آزاد DNA میتوکندریایی را بیش تر از DNA هسته دچار آسیب می کنند و از آن جایی که اسپرم ها دارای میتوکندریایی بیش تری می باشد، لذا آسیب DNA میتوکندریایی می تواند در تحرک و حتی بلوغ آن تداخل ایجاد نماید (۲۴، ۲۳). همان طور که پیش تر در مقدمه اشاره شد، آغوز دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بالایی می باشد، اما مطالعات اندکی اثرات مصرف آن را بر دیابت مورد ارزیابی قرار داده اند و تاکنون در هیچ مطالعه ای تاثیر آن بر سیستم تولید مثلی بیماران و یا مدل حیوانی دیابت مورد بررسی قرار نگرفته است. جهان تیغ و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثرات مصرف خوراکی آغوز گاوی را بر فعالیت آنتی اکسیدانی موش های دیابتی شده با آلوکسان مورد بررسی قرار دادند. یافته های آن ها نشان می دهد که مصرف ۴۰ روزه آغوز در موش های دیابتی سبب افزایش توان آنتی اکسیدانی و کاهش سطح MDA در موش های دیابتی گردید (۸). در مطالعه حاضر نیز مصرف ۸ هفته آغوز توانست در هر دو دوز، افزایش مقادیر MDA بافت بیضه را در موش های دیابتی به طور معنی داری مهار نماید. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۳ منتشر گردید، پژوهشگران اثرات مصرف خوراکی هشت هفته ای آغوز گاو (۱۰ گرم در روز) را در دو چرخه سواران حرفه ای مورد تحلیل قرار دادند. غلظت تستوسترون ورزشکاران در آغاز و پایان مطالعه اندازه گیری شد. پس از یک رقابت ۵ روزه دو چرخه سواری، نتایج نشان داد که ورزشکاران دریافت کننده آغوز در مقایسه با دو چرخه سواران گروه کنترل (دریافت کننده ۱۰ گرم پروتئین شیر) به طور معنی داری سطح تستوسترون بالاتری داشتند، به عبارتی مصرف آغوز گاو توانسته بود سبب مهار کاهش تستوسترون در دو چرخه سواران حرفه ای شود (۲۵). اثرات سودمند مشاهده شده مصرف آغوز در این پژوهش را می توان منتسب به ترکیبات موجود در آن دانست. همان طور که در مقدمه نیز اشاره شد، آغوز

گاو دارای مقادیر بالایی از ویتامین‌های A، E و C می‌باشد. اگرچه مقادیر ویتامین‌های یاد شده در آغوز کم‌تر از مقادیر استفاده شده در مطالعات و پژوهش‌های این حیطة می‌باشد، اما از آن جایی که تجمع این ویتامین‌ها و سایر مواد و ترکیبات در آغوز گزارش شده است، لذا می‌توان حضور توامان آن‌ها را در آغوز بر تعدیل عوارض دیابت اثرگذار دانست. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که مصرف هر یک از این ویتامین‌ها به تنهایی می‌تواند در کاهش عوارض دیابت بر سیستم تولید مثلی جنس نر موثر باشند. به عنوان مثال، طالبی و همکاران در سال ۲۰۱۴ مقاله‌ای را منتشر نمودند که در آن اثرات مصرف ۳۵ روزه ویتامین C خوراکی را در موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین مورد سنجش قرار داده بودند. پژوهشگران در پایان مطالعه این‌طور نتیجه‌گیری کرده بودند که مصرف ویتامین C (10 mg/kg) سبب بهبود پارامترهای تعداد، تحرک، مورفولوژی و حیات اسپرم در موش‌های دیابتیک شده بود (۲۶). در مطالعه دیگر، مصرف ۱۱۰ روزه ویتامین E (0.5 mg/kg) در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ توانسته بود از کاهش وزن بدن، وزن بیضه، تعداد و تحرک اسپرم، سطح تستوسترون و تعداد اسپرماتوگونی‌ها جلوگیری نماید و افزایش سطح MDA بافت بیضه را نیز در موش‌های دیابتیک مهار کند (۲۷). در مطالعه Kaplanoglu و همکاران که در سال ۲۰۱۳ منتشر گردید، اثرات مصرف جداگانه و همزمان ویتامین E و چای سبز بر تغییرات بافت بیضه رت‌های دیابتیک مورد بررسی قرار گرفت. آن‌ها مشاهده کردند که رت‌های دیابتیک که ویتامین E (0.4 mg/kg) به مدت ۴ هفته دریافت کرده بودند، در پایان مطالعه قند خون پائین‌تر و وزن بیش‌تری در مقایسه با گروه کنترل دیابتیک داشتند. در پژوهش یاد شده، اگرچه در زمان مطالعه، آسیب بافتی کم‌تری در نمونه‌های بیضه گروه دریافت‌کننده ویتامین E مشاهده شد، اما هم‌چنان در مقایسه با گروه کنترل سالم، اختلاف معنی‌داری در ابعاد بیضه، سلول‌های دچار آپوپتوز و ضخامت اپیتلیوم زایشی گزارش شده بود (۲۸).

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که ویتامین A در میوز و تمایز اسپرماتوگونی‌های به اسپرماتوسیت‌ها نقش کلیدی را ایفا می‌کند. بررسی اسپرماتوژنز در موش‌های دچار کمبود ویتامین A نشان داد که تمایز اسپرماتوگونی‌ها انجام نمی‌شود و با افزودن ویتامین A به رژیم غذایی این موش‌ها اسپرماتوژنز مجدد انجام شده و تولید اسپرم صورت می‌گیرد (۲۹). با توجه به مطالب فوق‌الذکر، به نظر می‌رسد آغوز به عنوان یک ترکیب طبیعی و دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا، نه تنها قادر است شاخصه اصلی که همان افزایش قند خون است را مهار نماید، بلکه با تاثیر مستقیم بر سیستم تولید مثلی جنس نر می‌تواند از پیشرفت آسیب‌های ناشی از دیابت بر این سیستم به خصوص در بافت بیضه و سلول‌های اسپرم نقش محافظتی خوبی را ایفا نماید. نتایج پژوهش حاضر کاملاً نشان می‌دهد که مصرف آغوز با تاثیر بر شاخص‌های اصلی باروری نظیر هورمون‌های جنسی، بافت بیضه و غلظت و تحرک اسپرم‌ها، توصیه تغذیه‌ای مفیدی جهت بیماران دیابتی به خصوص افراد واقع در سنین باروری در نظر گرفته شود. با این حال پیشنهاد می‌شود مطالعات بالینی در این خصوص طراحی و اجرا گردند. اگرچه تمام تلاش محققین پرداختن به تمام ابعاد تاثیر پذیر ناشی از آسیب دیابت بر سیستم تولید مثلی بوده است و سعی گردیده تا اثرات مصرف آغوز بر تمام آن‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد، اما به نظر می‌رسد عدم ارزیابی مورفولوژیک اسپرم و هم‌چنین عدم ارزیابی قدرت باروری گروه‌های مختلف به صورت عملی (جفت‌اندازی) از جمله محدودیت‌های این طرح باشد. از این‌رو پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آتی در این زمینه، مد نظر قرار گیرند.

سپاسگزاری

کلیه هزینه‌های انجام این پژوهش با تشریک مساعی نویسندگان تامین گردید و انجام آزمایشات در محل مرکز تحقیقات طب تجربی و آزمایشگاه جامع تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی بیرجند صورت

دکتر زربان و سرکار خانم ناسوتی که در تعیین سطح MDA بافت بیضه با راهنمایی‌های علمی و عملی خود ما را یاری نمودند، نیز تشکر و قدر دانی می‌گردد.

پذیرفت. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری مسئول محترم مرکز تحقیقات طب تجربی (جناب آقای دکتر فواد الدینی) جهت فراهم ساختن شرایط استفاده از امکانات این مرکز تقدیر و تشکر نمایند. از جناب آقای

References

- Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 94(3): 311-21.
- La Vignera S, Condorelli R, Di Mauro M, Lo Presti D, Mongioi L, Russo G, et al. Reproductive function in male patients with type 1 diabetes mellitus. *Andrology* 2015; 3(6): 1082-1087.
- Cavallini G. Male idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Asian J Androl* 2006; 8(2): 143-157.
- Kilarkaje N, Al-Hussaini H, Al-Bader MM. Diabetes-induced DNA damage and apoptosis are associated with poly (ADP ribose) polymerase 1 inhibition in the rat testis. *Eur J Pharmacol* 2014; 737: 29-24.
- Kim JW, Jeon WK, Kim EJ. Combined effects of bovine colostrum and glutamine in diclofenac-induced bacterial translocation in rat. *Clin Nutr* 2005; 24(5): 785-793.
- Xu M, Kim H, Kim H-J. Effect of dietary bovine colostrum on the responses of immune cells to stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *Arch Pharm Res* 2014; 37(4): 494-500.
- Uruakpa FO, Ismond MAH, Akobundu ENT. Colostrum and its benefits: a review. *Nutrition Research* 2002; 22(6): 755-767.
- Jahantigh M, Atyabi N, Poorkabir M, Jebelli Javan A, Afshar M. The effect of dietary bovine colostrum supplementation on serum malondialdehyde levels and antioxidant activity in alloxan-induced diabetic rats. *Iranian Journal of Veterinary Medicine* 2011; 5(1): 63-67.
- Pan D, Liu H. Preventive effect of ordinary and hyperimmune bovine colostrums on mice diabetes induced by alloxan. *Afr J Biotechnol* 2008; 7(24): 4369-4375.
- Kim JH, Jung WS, Choi NJ, Kim DO, Shin DH, Kim YJ. Health-promoting effects of bovine colostrum in Type 2 diabetic patients can reduce blood glucose, cholesterol, triglyceride and ketones. *J Nutr Biochem* 2009; 20(4): 298-303.
- Fard MH, Naseh G, Lotfi N, Hosseini SM, Hosseini M. Effects of aqueous extract of turnip leaf (*Brassica rapa*) in alloxan-induced diabetic rats. *Avicenna J Phytomed* 2015; 5(2): 148-158.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2): 351-358.
- Hami J, Vafaei-nezhad S, Ghaemi K, Sadeghi A, Ivar G, Shojae F, et al. Stereological study of the effects of maternal diabetes on cerebellar cortex development in rat. *Metab Brain Dis* 2016; 31(3): 1-10.
- Vafaei-Nezhad S, Hami J, Sadeghi A, Ghaemi K, Hosseini M, Abedini MR, et al. The impacts of diabetes in pregnancy on hippocampal synaptogenesis in rat neonates. *Neuroscience* 2016; 318: 122-133.

15. Shrilatha B, Muralidhara. Occurrence of oxidative impairments, response of antioxidant defences and associated biochemical perturbations in male reproductive milieu in the Streptozotocin- diabetic rat. *Int J Androl* 2007; 30(6): 508-518.
16. Amaral S, Moreno AJ, Santos MS, Seica R, Ramalho-Santos J. Effects of hyperglycemia on sperm and testicular cells of Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated rat models for diabetes. *Theriogenology* 2006; 66(9): 2056-2067.
17. 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): 482-488.
18. Soudamani S, Malini T, Balasubramanian K. Effects of streptozotocin-diabetes and insulin replacement on the epididymis of prepubertal rats: histological and histomorphometric studies. *Endocr Res* 2005; 31(2): 81-98.
19. Hassan AA, Hassouna MM, Taketo T, Gagnon C, Elhilali M. The effect of diabetes on sexual behavior and reproductive tract function in male rats. *J Urol* 1993; 149(1): 148-154.
20. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 2010; 107(9): 1058-1070.
21. Ghiravani Z, Hosseini M, Taheri MMH, Fard MH, Abedini MR. Evaluation of hypoglycemic and hypolipidemic effects of internal septum of walnut fruit in alloxan-induced diabetic rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2016; 13(2): 94-100.
22. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003; 79(4): 829-843.
23. Nakada K, Sato A, Yoshida K, Morita T, Tanaka H, Inoue S-I, et al. Mitochondria-related male infertility. *Proc Nati Acad Sci* 2006;103(41): 15148-15153.
24. Wei Y-H, Kao S-H. Mitochondrial DNA mutation and depletion are associated with decline of fertility and motility of human sperm. *Zoological Studies* 2000; 39(1): 1-12.
25. Shing CM, Peake JM, Suzuki K, Jenkins DG, Coombes JS. A pilot study: bovine colostrum supplementation and hormonal and autonomic responses to competitive cycling. *J Sports Med Phys Fitness* 2013; 53(5): 490-501.
26. Talebi AR, Mangoli E, Nahangi H, Anvari M, Pourentezari M, Halvaei I. Vitamin C attenuates detrimental effects of diabetes mellitus on sperm parameters, chromatin quality and rate of apoptosis in mice. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014; 181: 32-36.
27. Zakerabasali A, Keshavarz M, Mozafar A, Takhshid MA, Meshkibaf MH. Protective effects of vitamin E and selenium on spermatogenesis in adult male rat insulin-resistant. *J Fasa Univ Med Sci*. 2013; 2(4): 308-313.
28. Kaplanoglu GT, Bahcelioglu M, Gozil R, Helvacioglu F, Buru E, Tekindal MA, et al. Effects of green tea and vitamin E in the testicular tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *Saudi Med J* 2013; 34(7): 734-743.
29. Hogarth CA, Griswold MD. The key role of vitamin A in spermatogenesis. *J Clin Invest* 2010; 120(4): 956-962.