

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

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

جوادیات^۳

فرهاد شهامت^۳

زهرا 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

کشورها و پدیده شهر نشینی در کنار تغییر سبک زندگی مردم و کاهش فعالیت فیزیکی ابتلا به آن روز به روز در

دیابت یکی از شایع ترین بیماری های غیر واگیر و مزمن در سطح جهان است که همزمان با رشد و توسعه

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 ارشد 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. مرئی، 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 متابولسمی مانند هایپر لیپیدمی، عوارض کلیوی و هم‌چنین عوارض عصبی همراه بوده و از آن‌جائی که اسپرماتوزن روندی است که شدیداً از متابولیسم گلوکز تاثیر 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 متابولسمی 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 هیچ‌گونه 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

گروه‌ها به مدت ۸ هفته به صورت خوراکی (گاواژ) و روزانه یک مرتبه با مداخلات فوق‌الذکر 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 (۱۰mg/kg:۸۰) قرار گرفتند. سپس بلافاصله خونگیری قلبی از موش‌ها انجام شد و بیضه راست هر یک از موش‌ها توزین و جهت انجام پروسه بافت‌شناسی در محلول فیکساتیو بوئن قرار داده شد. بیضه چپ موش‌ها جهت اندازه‌گیری غلظت مالون دی‌آلدئید بافتی به تانک ازت انتقال داده شد و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. اپیدیدیم بیضه چپ جهت اندازه‌گیری غلظت و تحرک اسپرم‌ها جدا شد.

بررسی شمارش و تحرک اسپرم

اپیدیدیم چپ پس از جدا شدن بلافاصله درون پتری دیش حاوی ۴ میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی و یک میلی‌لیتر محیط HTF (سیگما، آمریکا) که قبلاً درون انکوباتور قرار گرفته بود، منتقل شده و دم اپیدیدیم به وسیله یک قیچی تیز و استریل قطعه‌قطعه گردید تا اسپرم‌ها بتوانند وارد محیط شوند. سپس پتری دیش درون انکوباتور CO₂ به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت (۵ درصد CO₂, ۳۷°C). به منظور شمارش اسپرم‌ها، 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 بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر صورت پذیرفت. به منظور بررسی تحرک اسپرم‌ها، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اولیه برداشته شده و بر روی لام هموسیستمتر قرار گرفت و اسپرم‌های متحرک مورد شمارش قرار گرفت.

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 کم‌تر از ۶ ساعت پس از زایمان به دست آمد و بلافاصله به ظرف‌های استریل منتقل و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد فریز گردید. نمونه‌های 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 سانتی‌گراد نگهداری گردید.

جهت ایجاد دیابت نوع یک از ماده استرپتوزوتوسین (شرکت سیگما آلد ریچ- آمریکا) استفاده شد. بدین منظور موش‌های ناشتا مورد تزریق درون صفاقی محلول استرپتوزوتوسین (حل شده در آب مقطر) با دوز ۵۰mg/kg قرار گرفتند. ۷۲ ساعت پس از تزریق، قندخون ناشتای موش‌ها توسط دستگاه قندخون جیبی (ACCU CHECK, Germany) و از طریق جراحی دمی مورد سنجش قرار گرفت. قند خون ناشتای مساوی یا بیش‌تر از ۳۵۰mg/dL به عنوان دیابتیک پذیرفته شد (۱۱). سپس موش‌های 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): موش‌های سالم دریافت‌کننده روزانه ۱/۵ میلی‌لیتر نرمال سالین.
- ۲- مدل دیابتیک (MOD): موش‌های دیابتی دریافت‌کننده روزانه ۱/۵ میلی‌لیتر نرمال سالین.
- ۳- آغوز ۱۰۰mg/kg (CL۱۰۰): موش‌های دیابتی دریافت‌کننده روزانه ۱۰۰mg/kg مکمل آغوز
- ۴- آغوز ۲۰۰mg/kg (CL۲۰۰): موش‌های دیابتی دریافت‌کننده روزانه ۲۰۰mg/kg مکمل آغوز.

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 $1/56 \times 10^5$ به صورت نانوگرم در میلی گرم پروتئین محاسبه گردید (۱۲).

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 اسپرما توگونی 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 ناپارامتری Kruskal-Wallis H test و در صورت معنی دار بودن آزمون مذکور از تست ناپارامتری 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

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 اسپرما توگونی ها) به وسیله میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) مشاهده و تصاویر توسط دوربین دیجیتال (BX51, Japan) کالیبره شده توسط لام هموسیتمتر متصل به میکروسکوپ تهیه

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		244/63 ± 19/87 #	1/66 ± 0/19 #	103/14 ± 3/18 #
MOD		138/63 ± 23/47*	0/99 ± 0/64 *	407/23 ± 52/49*
CL100		232/85 ± 21/25 #	1/46 ± 0/12 #	157/40 ± 23/14#
CL200		232/25 ± 18/88#	1/56 ± 0/84#	109/28 ± 9/68 #

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 100mg/kg آغوز؛

CL200: موش های دیابتی دریافت کننده دوز 200mg/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 کم تری 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 کم تری 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 200 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 همچنین 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 ($p=0/001$) 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		443 ± 0/51 #	363 ± 0/21 #	1524 ± 239 #
MOD		190 ± 0/33 *	278 ± 0/14 *	2344 ± 236*
CL100		315 ± 0/52 #	359 ± 0/22 #	1547 ± 265 #
CL200		389 ± 0/81 #	346 ± 0/34 #	1381 ± 289#

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 100mg/kg آغوز؛

CL200: موش های دیابتی دریافت کننده دوز 200mg/kg آغوز

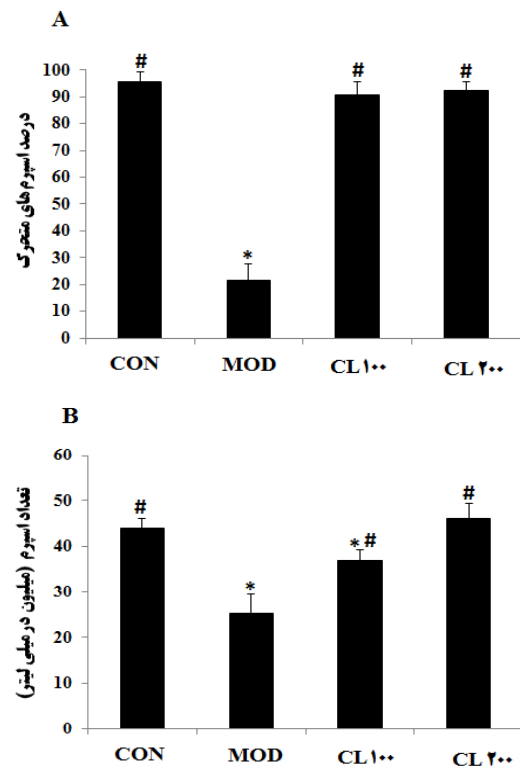
* تفاوت معنی دار ($p \leq 0/05$) در مقایسه با گروه کنترل،

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

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

بررسی‌های بافت‌شناسی 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 200 CL 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 100 CL ($p < 0/0001$) و هم‌چنین 200 CL ($p < 0/0001$) به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه مدل دیابتیک بود، اما هم‌چنان تعداد اسپرم در گروه 100 CL به‌طور معنی‌داری ($p = 0/04$) با گروه کنترل سالم اختلاف داشت و کم‌تر بود، اما گروه 200 CL تفاوت معنی‌داری را با گروه کنترل سالم نداشت ($p = 0/99$). درصد اسپرم‌های متحرک در گروه‌های 100 CL ($p = 0/46$) و 200 CL ($p = 0/73$) 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

گروه	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		$20/33 \pm 9/60^*$	$22669/59 \pm 3557/32^*$	$9266/52 \pm 2062/51^*$
CL100		$34/39 \pm 6/32$	$51592/84 \pm 3834/88^{*}\#$	$41637/40 \pm 5817/51^*\#$
CL200		$36/85 \pm 7/48$	$61293/83 \pm 1321/59$	$49273/49 \pm 4729/96$

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؛

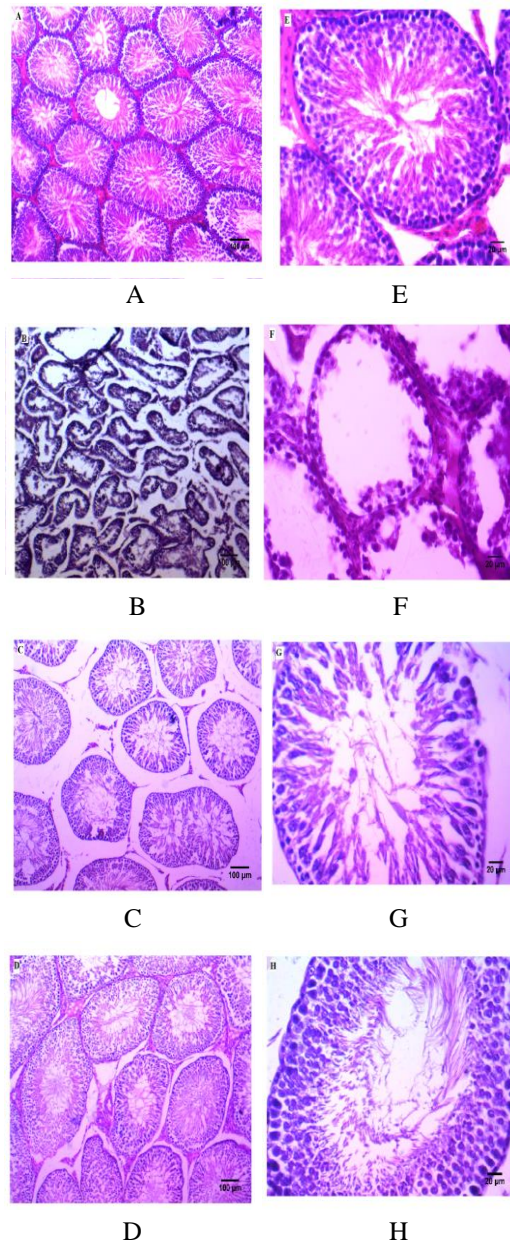
CL200: موش های دیابتی دریافت کننده دوز ۲۰۰ mg/kg آغوز.

* 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 ریزبینی 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 موش‌ها استفاده گردید. مطالعات مشابه متعددی نشان داده‌اند که این ترکیب با آسیب به سلول‌های بتا جزایر لانگرهانس پانکراس سبب می‌شود تا ترشح انسولین دچار کاهش شدید شده و در نتیجه دیابت نوع ۱ القا گردد (۱۴،۱۳). در مدل‌های دیابت ایجاد شده توسط استرپتوزوتوسین، آسیب به سیستم تولید مثلی جنس نر با افزایش اثر فعالیت‌های استرس اکسیداتیو به بافت بیضه و اپیدیدیم مشاهده می‌شود و مطالعات نشان داده‌اند این آسیب‌ها چه در فاز اولیه (هفته نخست) ایجاد دیابت چه در فاز پیشرفته آن (هفته ششم) مشاهده خواهند شد (۱۵). مطالعات متعدد بر روی مدل‌های حیوانی ایجاد دیابت نشان می‌دهند که دیابت در حیوانات سبب کاهش وزن بدن، وزن ارگان‌های جنسی، تعداد اسپرم اپیدیدیم و تحرک اسپرم‌ها می‌شود (۱۸-۱۶). علاوه بر این موارد، کاهش غلظت پلاسمایی تستوسترون و LH نیز در موش‌های دیابتی گزارش شده است (۱۹). مطالعات بافت‌شناسی بیضه در موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین نیز نشان داده‌اند که در مدل حیوانی دیابت لوله‌های اسپرم ساز کوچک شده و ضخامت اپیتلیوم زایشی کاهش می‌یابد (۱۸،۱۹). استرس اکسیداتیو به عنوان عامل اصلی ایجاد عوارض دیابت معرفی شده است (۲۰). از این‌رو افزایش توان آنتی‌اکسیدانی بدن و یا کاهش فعالیت‌های استرس اکسیداتیو به عنوان استراتژی‌های کنترل دیابت و عوارض آن مطرح می‌باشند (۲۱). گزارشات علمی نشان می‌دهند که در مایه انزالی ۴۰-۲۵ درصد مردان نابارور، مقادیر بالای رادیکال‌های آزاد که عامل اصلی آسیب استرس اکسیداتیو می‌باشند، یافت شده است و این نکته از این نظر حائز اهمیت می‌باشد که اسپرم به دلیل این که در غشای پلاسمایی آن اسیدهای چرب بلند زنجیر فراوانی وجود دارد، مستعد واکنش با رادیکال‌های آزاد بوده و در نتیجه مقادیر اندک رادیکال‌های آزاد نیز سبب بروز اختلال در تکامل و یا عملکرد اسپرم خواهند شد (۲۲). نکته مهم دیگری که در

خصوص ایجاد آسیب‌های استرس اکسیداتیو دارای اهمیت می‌باشد این است که رادیکال‌های آزاد DNA میتوکندریایی را بیش‌تر از DNA هسته دچار آسیب می‌کنند و از آن‌جائی که اسپرم‌ها دارای میتوکندریایی بیش‌تری می‌باشد، لذا آسیب DNA میتوکندریایی می‌تواند در تحرک و حتی بلوغ آن تداخل ایجاد نماید (۲۳،۲۴). همان‌طور که پیش‌تر در مقدمه اشاره شد، آغوز دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشد، اما مطالعات اندکی اثرات مصرف آن را بر دیابت مورد ارزیابی قرار داده‌اند و تاکنون در هیچ مطالعه‌ای 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 آنتی‌اکسیدانی موش‌های دیابتی شده با آلوکسان مورد بررسی قرار دادند. یافته‌های آن‌ها نشان می‌دهد که مصرف ۴۰ روزه آغوز در موش‌های دیابتی سبب افزایش توان آنتی‌اکسیدانی و کاهش سطح MDA در موش‌های دیابتی گردید (۸). در مطالعه حاضر نیز مصرف ۸ هفته آغوز توانست در هر دو دوز، افزایش مقادیر MDA بافت بیضه را در موش‌های دیابتی به‌طور معنی‌داری مهار نماید. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ منتشر گردید، پژوهشگران اثرات مصرف خوراکی هشت هفته‌ای آغوز گاو (۱۰ گرم در روز) را در دو چرخه سواران حرفه‌ای مورد تحلیل قرار دادند. غلظت تستوسترون ورزشکاران در آغاز و پایان مطالعه اندازه‌گیری شد. پس از یک رقابت ۵ روزه دو چرخه سواری، نتایج نشان داد که ورزشکاران دریافت‌کننده آغوز در مقایسه با دو چرخه سواران گروه کنترل (دریافت‌کننده ۱۰ گرم پروتئین شیر) به‌طور معنی‌داری سطح تستوسترون بالاتری داشتند، به عبارتی مصرف آغوز گاو توانسته بود سبب مهار کاهش تستوسترون در دو چرخه سواران حرفه‌ای شود (۲۵). اثرات سودمند مشاهده شده مصرف آغوز در این پژوهش را می‌توان منتسب به ترکیبات موجود در آن دانست. همان‌طور که در مقدمه نیز اشاره شد، آغوز

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که ویتامین A در میوز و تمایز اسپرماتوگونی‌های به اسپرماتوسیت‌ها نقش کلیدی را ایفا می‌کند. بررسی اسپرماتوزن در موش‌های دچار کمبود ویتامین A نشان داد که تمایز اسپرماتوگونی‌ها انجام نمی‌شود و با افزودن ویتامین A به رژیم غذایی این موش‌ها اسپرماتوزن 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 این رو 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

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 تجمیع این ویتامین‌ها و سایر مواد و ترکیبات در آغوز گزارش شده است، لذا می‌توان حضور توأمان 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 (۱۰ 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 (۵ 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 (۴ 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).

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 oligoasthenoeratozoospermia. *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 Natl 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, Pouretezari 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.