



بررسی اثر رسوراترول بر آسیب بیضه‌ای در رت‌های نر دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

آزاده شریف خطیبی^۱، عبدالحسین شیروی^{۱*}، حمید کلایان مقدم^۲

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

*مسئول مکاتبات: shiravi738@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۲۷

تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۲۵

چکیده

بیماری دیابت با تولید رادیکال‌های آزاد و ایجاد استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پیدایش آسیب‌های متابولسمی و بیضه‌ای ایفا می‌کند. این مطالعه با هدف شناخت و بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی رسوراترول در پیشگیری از عوارض اکسیداتیو ناشی از دیابت انجام گردیده است. در این مطالعه ۳۲ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار، با محدود وزنی ۲۵۰ تا ۲۸۰ گرم انتخاب و به ۴ گروه تقسیم گردیدند: شاهد سالم یا کنترل ۱، دیابتی یا تجربی ۱، سالم تیمار شده با رسوراترول یا کنترل ۲ و دیابتی تیمار شده با رسوراترول یا تجربی ۲. گروه دیابتی از طریق تزریق درون صفاقی ۵۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی استرپتوزوتوسین دیابتی شدند و رسوراترول در گروه‌های تیماری برای ۴ هفته با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مورد تزریق درون صفاقی قرار گرفت. چهار هفته پس از تیمار تمام گروه‌ها مورد مطالعات بافتی قرار گرفتند. در موش‌های دیابتی کاهش چشم‌گیری در قطر و تعداد سلول‌های زاینده مشاهده شد و در گروه درمانی با رسوراترول تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده به وسیله دیابت به طور معنی‌داری کاهش یافته و ازدیاد سلول‌های زاینده با افزایش معنی‌داری نسبت به گروه دیابتی همراه بوده است. رسوراترول با توانایی پیشگیری و درمان استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت نقش مهمی در بهبود آسیب‌های بیضه‌ای و همچنین کاهش میزان گلوکز خون ایفا می‌کند.

کلمات کلیدی: دیابت، رسوراترول، اسپوماتوزنز، رت

مقدمه

دیابت گروهی از بیماری‌های متابولیکی هستند که ویژگی آنها میزان بالای قند خون می‌باشد که علت بروز آنها نقص در ترشح انسولین یا عملکرد آن یا هر دو می‌باشد. امروزه یکی از مهم‌ترین عللی که باعث ناتوانی جنسی به خصوص در افراد مذکر می‌شود بیماری دیابت است مطالعات نشان می‌دهد که شیوع اختلال جنسی در مردان مبتلا به دیابت بیش از مردان غیردیابتی هم سن آنها می‌باشد. هایپرگلیسمی مزمن باعث فعال شدن پروتئین کیناز C، افزایش گلیکاسیون پروتئین‌ها، لیپیدها و در نتیجه تغییرات در فعالیت آنزیم‌های سلول می‌شود از طرفی اتواکسیداسیون‌های گلوکز، تولید رادیکال‌های فعال O₂ را

افزایش می‌دهد. استرس اکسیداتیو و آسیب‌های بیضه‌ای ناشی از آن باعث کاهش اسپرماتوزنز و کاهش فعالیت‌های جنسی می‌شود [۱]. عواملی که باعث عدم کارایی درست بیضه می‌شود و فرد را دچار ناتوانی جنسی می‌کند که شامل کاهش در تعداد و فعالیت اسپرم و کاهش در عملکرد و تولید هورمون مردانه‌ی تستوسترون می‌باشد [۵]. دیابت یک بیماری مزمن مادام‌العمر است که با پرنوشی و پر ادراری همراه است و عوارض بسیاری مثل درد، نوروپاتی، آسیب‌های چشمی (کاتاراکت)، آسیب به عروق، آسیب‌های بیضه‌ای، اسیدوز و اختلال در تولید هورمون‌ها را به دنبال دارد [۴]. در نتیجه بر طرف کردن ناتوانی‌های جنسی در



افراد مذکر در دنیای امروز حائز اهمیت است و بدین منظور در این زمینه اثر داروی رسوراترول را برای برطرف کردن آسیب‌های بیضه‌ای رت نر دیابتی شده مورد بررسی قرار داده‌ایم. رسوراترول ۵، ۴، ۳ تری‌هیدروکسی استیلن متعلق به گروه بزرگی از پلی‌فنول‌ها است که در گیاهان یافت می‌شود. غنی‌ترین منبع طبیعی رسوراترول که در طب مردم شرقی استفاده می‌شده است عصاره ریشه گیاهی است به نام پلی‌گونوم کوپسیداتوم، و همچنین مقدار قابل توجهی از رسوراترول در بین گیاهان دیگری مانند بادام زمینی، شراب قرمز، آب انگور قرمز و چای چینی یافت شده است [۳، ۱۰]. جدا از منابع طبیعی این ترکیب اخیراً در قرص‌ها قابل دسترس است و به عنوان مکمل رژیم غذایی توصیه می‌شود. فعالیت گسترده مواد اصلی رسوراترول در سطح سلولی علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی و خاصیت حفاظت قلبی و خواص ضدسرطانی شامل موارد دیگری از جمله تاثیر در بافت‌های نوپدید، نوروپاتی، اثر بر بافت چشم، اثر بر کاهش چربی و اثر بر کاهش قند خون می‌باشد [۹، ۱۱]. تأثیرات دفاعی رسوراترول از طریق تنظیم مسیر eEF2 (Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase) ممکن و میسر است [۷]. با توجه به شواهد متعدد در خصوص نقش موثر رسوراترول در کاهش عوارض ناشی از قند خون شامل برهم زدن تعادل اکسیداسیون و احیا، افزایش فعالیت آلدوز ردوکتاز، تغییر در فعالیت پروتئین‌کیناز C و سایر عوامل ایجاد استرس اکسیداتیو در این مطالعه تأثیر رسوراترول در دوز فارماکولوژیک بطور دراز مدت بر آسیب‌های بیضوی مورد بررسی قرار گرفته است [۵].

مواد و روش کار

۳۲ سر موش رت نر بالغ از نژاد ویستار از موسسه پاستور آمل تهیه شده و در چهار گروه هشت‌تایی زیر دسته‌بندی شدند: شاهد سالم (کنترل)، گروه سالم + تیمار با رسوراترول (تجربی ۱)، گروه دیابتی (کنترل ۲)، گروه دیابتی

+ تیمار با رسوراترول (تجربی ۲) و در کنار این گروه‌ها یک گروه الکلی شم قرار داده شد زیرا رسوراترول با ۲۰٪ الکلی و ۸۰٪ آب مقطر حل شد. موش‌ها همزمان با تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین (STZ) که با بافر سیترات به صورت محلول درآمده بود به صورت ۵۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم دیابتی شدند. و گروه‌های دریافت کننده رسوراترول آن را به صورت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند. تزریقات روزی یکبار و به مدت ۲۸ روز پشت سر هم صورت گرفت. در تمام مدت آزمایش شرایط نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و دما حفظ گردید [۲۰، ۲۱، ۲۲]. ۲۸ روز پس از تجویز جهت مطالعات مرفومتريک و هیستولوژیک حیوانات به وسیله تزریق درون صفاقی داروهای کتامین و زایلین به نسبت ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کتامین و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم زایلین بیهوش شدند و پس از بیهوشی شکم آنها باز شده و اندام‌های تناسلی دو طرف شامل بیضه و اپی‌دیدیم و واژودفران خارج گردید. بیضه‌ها توسط ترازوی دیجیتال وزن شده (با دقت ۰/۰۰۱) و با ابزار کولیس طول و عرض بیضه و سپس حجم آن اندازه گیری شد سپس بیضه‌ها درون فرمالدئید ۱۰٪ قرار گرفتند تا مراحل آماده‌سازی را جهت مطالعات بافتی طی نمایند. پس از تهیه مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین و ائوزین صورت گرفت. تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سلول‌های سرتولی در زیر میکروسکوپ توسط عدسی شیئی ۴۰× به روش میدانی شمارش گردید. برای شمارش اسپرم‌ها ابتدا اپیدیدم را از بیضه جدا کرده و سپس دم آن از بخش‌های دیگر جدا شد و تعداد اسپرم‌ها توسط لام نوبار شمارش گردید. قطر لوله‌های اسپرم‌ساز نیز با روش سینگ اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS تجزیه و تحلیل شدند و برای مقایسه میانگین بین گروه‌ها از آنالیز واریانس یکطرفه و



اسپرمتوسیت، اسپرماتید، سرتولی و اسپرم و همچنین افزایش معنی‌دار قطر لوله اسپرم‌ساز است ولی در گروه دیابتی این روند کاهش یافته است. تغییرات مورفومتریک بیضه در گروه‌های تیمار شده با رسوراترول با افزایش طول، حجم، قطر و وزن بیضه همراه بوده است و به طور عکس در گروه دیابتی این تغییرات با کاهش چشم‌گیری مواجه بوده است. با توجه به جدول تغییرات مورفومتریک بیضه می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که تغییرات ریختی بیضه در تیمار با رسوراترول با افزایش طول، حجم، قطر و وزن بیضه همراه بوده و به طور عکس در گروه دیابتی این تغییرات با کاهش چشم‌گیری مواجه بوده است و همچنین تغییرات اسپرماتوژنز در گروه تیماری با رسوراترول با افزایش در تعداد سلول‌های سرتولی، اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت ۱، اسپرماتید و اسپرم و همچنین با افزایش قطر لوله اسپرم‌ساز همراه بوده و این تغییرات در گروه دیابتی با کاهش روند اسپرماتوژنز همراه بوده است. جدول ۱ تغییرات اسپرماتوژنز و جدول ۲ تغییرات مورفولوژیک بیضه در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهند. اشکال ۱ تا ۵ مقاطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهند.

در مواردی که پاسخ معنی‌داری دیده شد از آزمون تعقیبی توکی برای یافتن جایگاه اختلاف استفاده شد. از نظر آماری، $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد و مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند.

نتایج

در این مطالعه حیوانات دیابتی شده دچار کاهش سریع وزن بدن پرنوشتی و پر اداری که از عوارض ناشی از دیابت است شدند. اندازه‌گیری وزن بدن بین گروه‌های کنترل و بیماری نشان داد که تزریق رسوراترول باعث افزایش معنی‌دار وزن بدن در گروه دیابتی و کاهش معنی‌دار وزن بدن در گروه سالم می‌شود. در ارزیابی میزان گلوکز خون تزریق دارو باعث کاهش معنی‌دار قند خون در گروه‌های تیماری با رسوراترول شد و همچنین تزریق دارو باعث افزایش معنی‌داری در وزن، حجم و قطر بیضه گردید. همچنین در گروه‌های تیماری افزایش معنی‌داری در تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید، سرتولی و همچنین تعداد اسپرم و افزایش قطر لوله اسپرم‌ساز دیده می‌شود. تغییرات اسپرماتوژنز مشاهده شده در گروه‌های تیمار شده با رسوراترول نشان دهنده افزایش در روند اسپرماتوژنز است که با افزایش معنی‌دار در تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی،

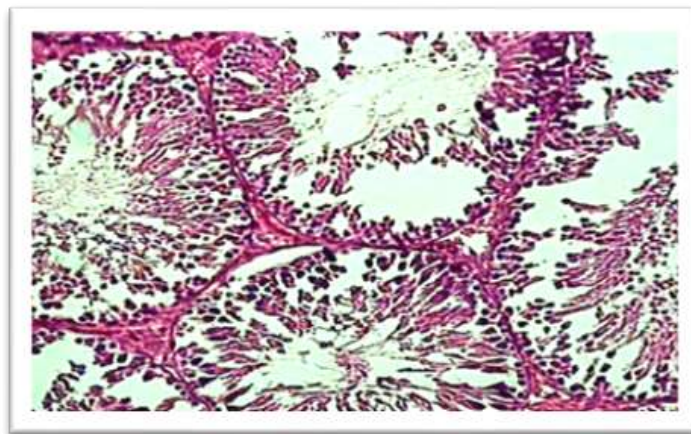
جدول ۱- تغییرات اسپرماتوژنز در گروه‌های تیمار شده با رسوراترول

پارامترها	سالم	دیابتی	دیابتی و رسوراترول	سالم و رسوراترول
تعداد اسپرماتوگونی	34.67 ± 3.14	25.67 ± 1.75	30.83 ± 3.06	57.50 ± 2.881
تعداد اسپرماتوسیت ۱	57.50 ± 4.087	47.67 ± 1.663	51.67 ± 5.428	80.00 ± 2.828
تعداد اسپرماتید	274.33 ± 14.278	220.00 ± 24.495	264.00 ± 25.807	308.50 ± 18.042
تعداد سلول سرتولی	16.33 ± 1.21	13.17 ± 1.47	14.17 ± 1.47	21.00 ± 1.78
قطر لوله اسپرم‌ساز	239.166 ± 8.465	185.416 ± 13.268	216.250 ± 5.645	243.541 ± 4.063
تعداد اسپرم	187 ± 4763795.7555	116 ± 6723869.1738	124 ± 5520416.6509	194 ± 3027650.3541

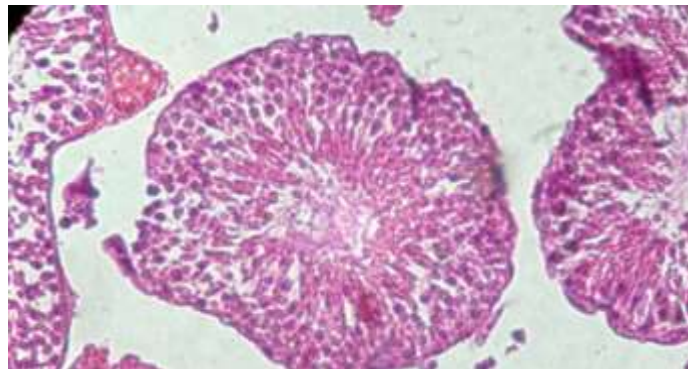


جدول ۲- تغییرات مورفومتریک بیضه در گروه های تیمار شده با رسوراترول

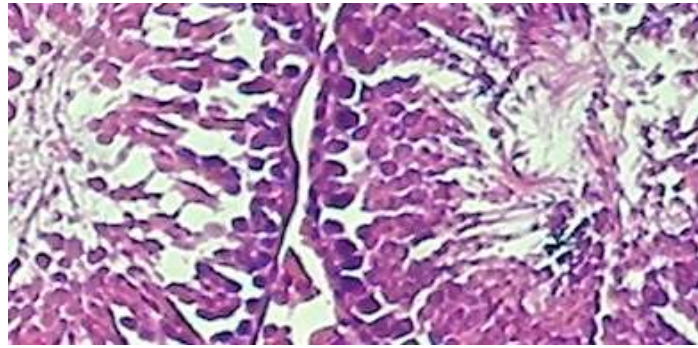
متغیرها	سالم	دیابتی	دیابتی و رسوراترول	سالم و رسوراترول
وزن بیضه (گرم)	1.631 ± 0.069	1.270 ± 0.068	1.330 ± 0.043	1.446 ± 0.046
حجم بیضه (سانتی متر مکعب)	1.0505 ± 0.085	0.636 ± 0.083	0.927 ± 0.015	1.596 ± 0.066
طول بیضه (میلی متر)	2.191 ± 0.305	1.460 ± 0.569	1.728 ± 0.213	2.125 ± 0.234
قطر بیضه (میلی متر)	1.160 ± 0.046	0.911 ± 0.050	1.012 ± 0.006	1.203 ± 0.026



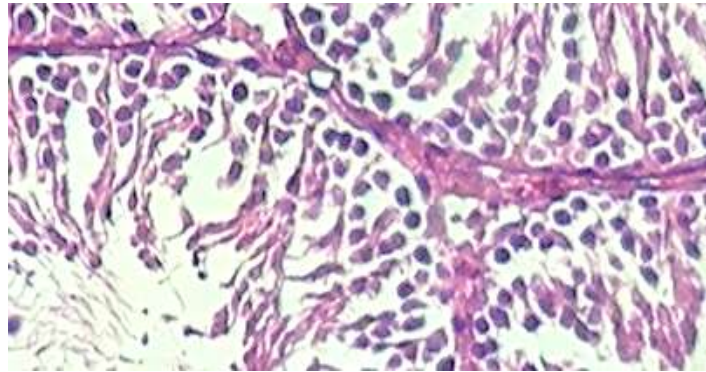
شکل ۱- برش عرضی از لوله های اسپرم ساز گروه دیابتی با بزرگنمایی ۴۰۰



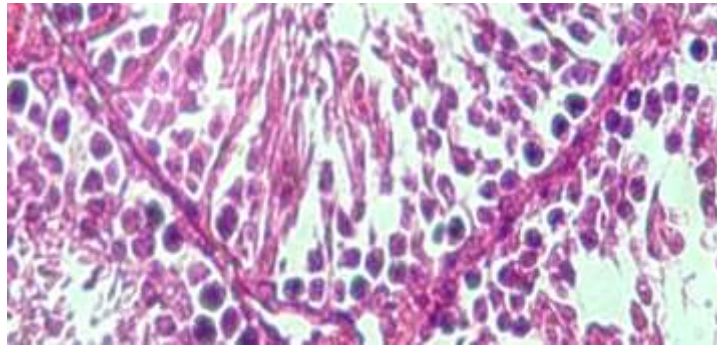
شکل ۲- برش عرضی از لوله های اسپرم ساز گروه سالم با بزرگنمایی ۴۰۰



شکل ۳- برش عرضی از لوله‌های اسپرم‌ساز گروه سالم تیمار شده با رسوراترول با بزرگنمایی ۴۰۰



شکل ۴- برش عرضی از لوله‌های اسپرم‌ساز گروه دیابتی تیمار شده با رسوراترول با بزرگنمایی ۴۰۰



شکل ۵- برش عرضی از لوله‌های اسپرم‌ساز گروه الکلی با بزرگنمایی ۴۰۰

بحث

دستگاه ادراری تناسلی و بیماری دیابت شرایط برای ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول فراهم می‌شود [۶]. بنابراین باید تعادل یا بالانسی بین تولید ROS و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی وجود داشته باشد و به هم خوردن این تعادل می‌تواند نقش بحرانی در باروری مردان داشته باشد. در این پژوهش نشان

در حالت طبیعی مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی موجود در دستگاه تولیدمثلی می‌تواند با گونه‌های اکسیژن واکنشی یا ROS مقابله نماید و از روند استرس اکسیداتیو و کلاً آسیب اکسیداتیو گنادی و اسپرماتوزوئید بالغ محافظت نماید و در طی بیماری از جمله مسمومیت‌ها و عفونت، التهاب



در این پژوهش رسوراترول با کاهش استرس اکسیداتیو، کاهش تولید رادیکال‌های آزاد، کاهش آپوپتوز و نقش آنتی-اکسیدانی خود احتمالاً توانسته است با اثرات مخرب دیابت از جمله افزایش استرس اکسیداتیو، افزایش رادیکال آزاد و افزایش ایجاد آپوپتوز مبارزه کند. سلول‌های اسپرم پستانداران دارای مقادیر بالای اسید چرب اشباع، پلاسموژن و اسفنگومیلین است که سوبستراهای مهم در عمل اکسیداسیون به شمار می‌روند به طور کلی دیابت منجر به اکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA گردیده که بخاطر ایجاد رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت است پس می‌توان نتیجه گرفت آسیب‌های شدیدی به بافت بیضه وارد شود [۷].

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از آزمایش ۲۸ روزه درمان با رسوراترول در رابطه با تغییرات وزن، حجم، طول و قطر بیضه و تعداد اسپرم می‌توان این گونه نتیجه گرفت که رسوراترول باعث افزایش در اندازه بافت بیضه گروه دیابتی تیمار شده با رسوراترول در مقایسه با گروه دیابتی و همچنین باعث افزایش اندازه‌ی بافت بیضه و اسپرماتوزن در افراد سالم تیمار شده با رسوراترول در مقایسه با گروه سالم شده است. در نتیجه کاهش طول، قطر، حجم و وزن با توجه همبستگی تعداد سلول‌های زاینده و تعداد سلول‌های سرتولی واضح است. همچنین همانطور که از نتایج بر می‌آید کاهش چشمگیری در میزان گلوکز خون در گروه تیمار شده با رسوراترول دیده می‌شود و تفاوت معنی‌داری در میزان قند خون مشاهده می‌شود و تغییرات وزن بدن که می‌تواند در اثر بهبود عملکرد سلول‌های بتای پانکراس و افزایش انسولین باشد

منابع

1- Ahmadpour S.H., Sadeghi Y. (2008), Effect of insulin and ascorbic acid therapy

داده شده که تجویز رسوراترول به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی به موش‌های دیابتی شده به مدت ۲۸ روز باعث افزایش معنی‌دار در تعداد اسپرماتوگونی، اسپرماتویست I و اسپرماتید و سلول‌های سرتولی نسبت به گروه دیابتی گردیده است. رسوراترول به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی باعث تحریک سیستم آنتی‌اکسیدانی داخلی و فعالیت سازه‌های آنزیمی و غیرآنزیمی می‌شود و با القای گونه‌های mRNA برای سوپر اکسید دسیموتاز (SOD)، گلووتاتیون پراکسیداز (GP_x) و گلووتاتیون s-ترانسفراز (GST) باعث افزایش فعالیت واکنشی آنها می‌شود چون این آنزیم‌ها دفع کننده رادیکال‌های آزاد می‌باشند [۳].

این پژوهش نشان می‌دهد که گروه درمانی دیابتی تیمار شده با رسوراترول در مقایسه با گروه شاهد دیابتی افزایش معنی‌داری در تعداد سلول‌های اسپرم و اسپرماتید داشته که این نشان می‌دهد رسوراترول می‌تواند باعث بهبود اسپرماتوزن در افراد دیابتی شود و هم چنین نشان می‌دهد که گروه درمانی سالم تیمار شده با رسوراترول در مقایسه با گروه سالم شاهد نیز افزایش اسپرماتوزن به صورت معنی‌دار وجود دارد که می‌توان نتیجه گرفت سیستم‌های آنتی-اکسیدانی در افراد سالم هم می‌توانند با مهار اکسیژن واکنشی ROS و کاهش استرس اکسیداتیو باعث افزایش تعداد اسپرم و افزایش قدرت باروری گردند. چون اسپرماتوزن یک فرآیند تولیدمثلی بی‌نهایت فعال است که قادر به تولید حدود ۱۰۰۰ اسپرم در ثانیه می‌باشد نرخ‌های بالای تقسیم سلولی در این فرآیند دلالت بر مصرف بالای اکسیژن میتوکندریایی به وسیله اپی‌تلیوم ژرمینال دارد فشار اکسیژن در بافت بیضه خیلی پایین است و رقابت برای این عنصر حیاتی درون بیضه‌ها خیلی شدید است و رسوراترول باعث بهبود سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد و آثار مخرب آنها شده است [۲].



sclerosis. *The EMBO Journal or Biomedical Ethics Ontology*, 126(13): 156-168.

7- Nkuhn Velten R., Schermer W. (1984), Effect of stz - induced hyperglycaemia on androgen - binding protein in rat testis and epididymis. *EMBO Journal or Biomedical Ethics Ontology*, 26: 300-303.

8- Palbrasnyo H., Gergo A., Molnar A. (2009), Resveratrol improves insulin sensitivity reduces oxidative stress and activates the act pathway in diabetic patients pathogenesis and potential treatments. *Neurotherapeutics*, 6(4): 648-655.

9- Stephen D. (2011), resveratrol may boots eye health background of the pathogenesis-oriented therapy. *Orvosi Hetilap Research*, 14: 516-527.

10- Winkler G, Kempler P. (2010), Pathomechanism of diabetic neuropathy background of the pathogenesis-oriented therapy. *Orvosi Hetilap Research*, 151(24): 971-981.

11- Yuriy K., Bashmako V., Samirassad K.H. (2011), resveratrol maybe benetifical in treatmeat of diabetic foot syndrome background of the pathogenesis-oriented therapy. *Orvosi Hetilap Research*, 14: 798-811.

on plasma cu level in STZ-induced diabetic rats. *Journal of Nutrition Science and Vitaminology*, 54(4): 321-328.

2- Carina Duarte V., Suelenmer O. (2010), resveratrol and red wine function as antioxidants in the central nervous system without cellular proliferative effects during experimental diabetes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38: 504-512

3- Cui X.P., By L., Gao I., Wei H.Q., Wang N. (2008), Effects of grape seed proanthocyanidin extracts on peripheral nerves in streptozocin-induced diabetic rats. *Journal of Nutrition Science and Vitaminology*, 54(4): 198-206.

4- Dinh T., Veves A. (2005), Microcirculation of the diabetic foot. *Current Pharmaceutical Design*, 11(18): 2301-2309.

5- Figueroa Romero C., Sadidi M., Feldman E.L. (2008), Mechanisms of disease the oxidative stress theory of diabetic neuropathy. *Journal of Nutrition Science and Vitaminology*, 54(4): 213-218.

6- Kim D., Nguyenm D., Dobbin M., Fischer A., Sananbenesi F., Rodgers J. (2007), SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral

