

## ***Protective effects of hydro-alcoholic garlic extract on spermatogenic disorders in streptozotocin-induced diabetic C57BL/6 mice***

Soleimanzadeh A., PhD<sup>1</sup>, Malekifard F., MSc<sup>2</sup>, Kabirian A.R., MSc<sup>3</sup>

1. Assistant Professor, Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, (Corresponding Author), Tel:+98-44-32774737, a.soleimanzadeh@urmia.ac.ir

2. Department of Microbiology, Faculty of veterinary medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

3. Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

### **Abstract**

**Background and Aim:** Diabetes can cause sexual dysfunction including spermatogenic disorders in the diabetic patients. The aim of the present study was to investigate the antioxidant effects of garlic extract in diabetic mice.

**Materials and Methods:** Diabetes was induced by multiple low-dose streptozotocin injections (40 mg/kg/day for 5 consecutive days), in male C57BL/6 mice (15-20 gr body weight). After induction of diabetes, the mice were divided into 4 groups: group 1 (normal control group); group 2 (diabetic control group); group 3 (treatment with garlic extract 200 mg/kg for 35 days) and group 4 (treatment with garlic extract 400 mg/kg for 35 days). Mice were euthanized on the 35<sup>th</sup> day and serum testosterone levels were estimated. Testes and epididymis were removed for sperm evaluation and measurement of nitric oxide (NO) levels and total antioxidant capacity (TAC).

**Results:** Garlic treatment significantly improved semen parameters and increased serum level of testosterone ( $p < 0.05$ ). Aside from reducing the elevated tissue nitric oxide level, garlic increased total antioxidant capacity in testis tissue samples.

**Conclusion:** This study showed potent antioxidant effect of hydro-alcoholic garlic extract on the testes of mice against type 1 diabetes -induced oxidative stress.

**Keywords:** Type 1 diabetes, Garlic, Spermatogenesis, Nitric oxide, Total antioxidant capacity.

**Received:** Nov 21, 2016      **Accepted:** May 13, 2017

## بررسی اثرات محافظتی عصاره هیدروالکلی سیر بر اختلالات اسپرمتوزن در موش های C57BL/6 دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

علی سلیمان زاده<sup>۱</sup>، فرین ملکی فرد<sup>۲</sup>، علیرضا کبیریان<sup>۳</sup>

۱. استادیار گروه مامایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (مؤلف مسوول)، تلفن ثابت: ۰۴۴-۳۲۷۷۴۳۷، a.soleimanzadeh@urmia.ac.ir

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۳. گروه مامایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** دیابت می تواند سبب اختلالات جنسی از جمله اختلالات اسپرمتوزن در افراد گردد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات آنتی اکسیدانی عصاره هیدروالکلی سیر، در موش سوری دیابتی شده می باشد.

**روش بررسی:** دیابت بوسیله استرپتوزوتوسین در موش های نر C57BL/6 (۲۰-۱۵گرم وزن) القا شد (روزانه ۴۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن برای ۵ روز متوالی). موش ها بعد از القای دیابت به ۴ گروه تقسیم شدند: گروه ۱ (کنترل نرمال)؛ گروه ۲ (گروه کنترل دیابتی)؛ گروه ۳ (گروه درمان با عصاره گیاه سیر ۲۰۰g/kg به مدت ۳۵ روز) و گروه ۴ (گروه درمان با عصاره گیاه سیر ۴۰۰g/kg به مدت ۳۵ روز). موش ها در روز ۳۵ کشته شده و سطح تستوسترون سرمی مورد ارزیابی قرار گرفت. بیضه و اپی دیدیم آنها برای ارزیابی اسپرم و میزان نیتریک اکساید و ظرفیت تام آنتی اکسیدانی خارج گردید.

**یافته ها:** عصاره سیر توانست سبب بهبود پارامترهای اسپرم و افزایش سطح تستوسترون سرم گردد ( $p < 0/05$ ). علاوه بر کاهش میزان نیتریک اکساید، عصاره سیر سبب افزایش ظرفیت تام آنتی اکسیدانی نمونه های بافت بیضه ای گردید.

**نتیجه گیری:** این نتایج نشان می دهد که عصاره هیدروالکلی سیر به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی می تواند بافت بیضه را در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت تیپ ۱ محافظت کند.

**واژگان کلیدی:** دیابت نوع ۱، سیر، اسپرمتوزن، نیتریک اکساید، ظرفیت تام آنتی اکسیدانی

وصول مقاله: ۹۵/۹/۱ اصلاحیه نهایی: ۹۶/۱/۲۷ پذیرش: ۹۶/۲/۲۳

## مقدمه

اشتها آور یاد شده است (۱۱). سیر دارای ملاتونین می باشد که به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی از دژرنه شدن با سلول های زاینده جلوگیری می کند. ملاتونین سیستم آنتی اکسیدانی داخلی را تحریک می کند و فعالیت گلوکوتایون پراکسیداز، گلوکوتایون S-ترانسفراز، سوپراکسید دیسموتاز و دیگر تیول ها را در خون، کبد، بیضه و کلیه افزایش می دهد (۱۲). آنتی اکسیدانها خط مقدم مبارزه بر علیه رادیکال های آزاد اکسیژن هستند (۶). مطالعات متعددی از تاثیر سیر بر بیماری دیابت صورت گرفته است (۱۴ و ۱۳) ولی تاثیر سیر به عنوان یک آنتی اکسیدان بر میزان تستوسترون سرم، پارامتر های منی، ظرفیت آنتی اکسیدانی تام و میزان نیتریک اکساید بافت بیضه موش های دیابتی تا کنون مورد بررسی قرار نگرفته بود لذا در این مطالعه تاثیر سیر بر این فاکتور ها در موش های دیابتی مورد ارزیابی قرار گرفت.

## روش بررسی

در این مطالعه که به صورت تجربی انجام شد، از ۳۲ سر موش سوری نر نژاد خالص C57BL/6 با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته (وزن ۲۰-۱۵ gr) که از انیستیتو پاستور ایران خریداری شده بودند، بکار گرفته شد. این موش ها در حیوان خانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه در شرایط استاندارد آب، غذا، دما و نور کافی نگهداری شدند. کلیه مراحل این تحقیق در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه ارومیه مورد تایید قرار گرفت.

موش ها بعد از اطمینان از القاء دیابت در آن ها به صورت تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. گروه ۱ شامل موش های سالمی بودند که تحت هیچ تیماری قرار نگرفتند و فقط بافر سیترات با  $\text{pH} = 4/5$  به آن ها تجویز می شد. گروه ۲ شامل موش های دیابتی بودند که تنها دیابت در آنها القاء شده بود (گروه کنترل دیابتی). گروه ۳ شامل موش هایی بودند که بعد از القاء دیابت عصاره سیر (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه بصورت گاوژ) دریافت کرده، گروه ۴ شامل موش هایی بودند که بعد از القاء دیابت عصاره سیر

دیابت ناشی از اختلال در متابولیسم کربوهیدرات، چربی ها و پروتئین ها است که بر اثر فقدان ترشح انسولین یا کاهش حساسیت بافتها به انسولین ایجاد می شود (۱). این بیماری عوارض حاد و مزمن بسیاری بر اندام های مختلف دارد و اختلالاتی چون نوروپاتی (۲) و اختلال در رفتارهای جنسی و بافت تولیدمثلی (۳) ایجاد می کند. این عوارض در بافت تولیدمثلی جنس نر به صورت کاهش تعداد اسپرم (۴)، کیفیت پایین مایع سمینال (۵)، کاهش هورمون تستوسترون (۶) و کاهش سلولهای رده اسپرم ساز (۷) بروز می نماید. علاوه بر این بیضه ها به عوامل محیطی القاکننده مرگ سلولی نیز حساس بوده و آپوپتوز سلولهای ژرمینال نیز در طی استرس های غیرفیزیولوژیک نظیر: ایسکمی، افزایش دما، تشعشع و دیابت ممکن است ایجاد گردد (۸). آسیب های اکسیداتیو وارده به بافت بیضه منجر به تغییرات بیوشیمیایی و هورمونی می شود و متعاقب آن میل جنسی و رفتارهای جنسی کاهش می یابد (۹) و بافت های تولیدمثلی نیز متحمل آسیب می شوند.

گیاهان دارویی سال های زیادی است که در سراسر جهان برای درمان و پیشگیری از بعضی بیماریها استفاده می شوند. اما اثرات تعدادی از آنها به طور عملی بررسی شده است. گیاهان دارویی، روشهای درمانی مفیدی هم در سیستم های مدرن و هم سنتی هستند. گونه های آلیوم مانند سیر و پیاز به عنوان ماده غذایی، ادویه، چاشنی و داروی محلی مصرف می شوند. سیر با نام علمی (*Allium sativum*) متعلق به خانواده *Lilaceae* توجه ویژه ای را در میان گیاهان جدید به خود جلب کرده است زیرا در سراسر جهان گسترده شده و در دسترس است (۱۰). سیر دارای ترکیبات مختلف از جمله پروستاگلاندین ها، پکتین، آدنوزین، ویتامین های E، A, B1, B2, B6, C، بیوتین، اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه ضروری می باشد (۱۱). برای این گیاه اثرات درمانی و خواص متعددی بیان شده است چنانچه از آن به عنوان ضد عفونی کننده دستگاه گوارش، گیاه محرک، مدر،

(۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه بصورت گاوآژ) دریافت کردند. همه گروه ها به مدت ۳۵ روز متوالی به این روش درمان شدند.

القاء دیابت:

قبل از تجویز هر دوز STZ (streptozotocin) موش ها به مدت چهار ساعت ناشتا می شدند و حتی پوشال بستر آن ها نیز جمع آوری می شد، سپس STZ (Sigma, Germany) را به صورت داخل صفاقی تا پنج روز متوالی آوری می شد (۴۰ mg/kg در ۲۰۰ میکرولیتر سیترات بافر با pH= 4/5 که ۱۰ دقیقه قبل از تجویز حل می شد). موش ها زمانی دیابتی شده ارزیابی می شدند که میزان قند خون ناشتا آن ها بیشتر از ۲۵۰ mg/dl بود. ارزیابی قند خون ناشتا نیز توسط سرنگ های انسولینی بعد از مقید کردن موش ها از ورید دمی آن ها اقدام به خون گیری کرده و سپس توسط دستگاه خودکار گلوکومتر (Accu-Chech Compact plus, Irland) اندازه گیری شد.

پس از اتمام دوره درمان، بلافاصله خونگیری از قلب موش ها انجام شد و نمونه های خونی به لوله های هپارینه منتقل گردید و پس از انجام سانتریفیوژ ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه، غلظت سرمی تستوسترون اندازه گیری گردید. پس از آسان کشی موش ها، بیضه آنها برای ارزیابی اسپرم و بررسی پارمترهای منی و سنجش میزان نیتریک اکساید و ظرفیت تام آنتی اکسیدانی خارج شدند. جهت جمع آوری اسپرم، با ایجاد برش در ناحیه شکم، دم اپی دیدیم را از بیضه جدا کرده و به ۵ ml محیط HTF (Human Tubal Fluid) (sigma, USA)، حاوی Bovine Serum Albumen (sigma, USA)، انتقال یافت و بعد از ایجاد چند برش در دم اپی دیدیم برای خروج اسپرم ها در داخل انکوباتور CO<sub>2</sub> ۵٪ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته شد. بعد از ۰/۵ ساعت اسپرم ها خارج و در محیط پخش شدند. در نهایت بعد از جمع آوری اسپرم، برای هر گروه از ۱۴ میکرولیتر سوسپانسیون اسپرم استفاده می شود.

ارزیابی پارمترهای منی:

برای ارزیابی تحرک اسپرم ها، نمونه ی اسپرم مطابق با روش بالا استحصال شدند و متعاقب رقیق سازی اسپرم ها برای هر موش در هر گروه ۱۰ قطره جهت ارزیابی تحرک اسپرم ها مورد استفاده قرار گرفت. برای تعیین درصد تحرک، ۱۰۰ خانه از ۲۵ میدان میکروسکوپی که به شکل تصادفی انتخاب می شدند ارزیابی شدند و سپس میانگین آنها بر اساس درصد تحرک ثبت می شد (۱۵)، همچنین برای شمارش اسپرم ها از روش استاندارد لام هموسایتومتری استفاده شد که برای هر موش در هر گروه ۲۰ قطره مورد استفاده قرار گرفت (۱۶).

جهت بررسی میزان زنده بودن اسپرم از رنگ آمیزی ائوزین - نگرزین استفاده شد. به این صورت که یک قطره ائوزین ۱٪ و به دنبال آن یک قطره نگرزین ۵٪ روی لام گرم شده بر روی صفحه میکروسکوپ، که در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تنظیم شده بود، قرار داده شد و سپس به آرامی یک قطره از نمونه منی به رنگ ها اضافه گردید. پس از مخلوط کردن منی با رنگ های فوق از هر نمونه ۴ گسترش تهیه شد (۱۷). پس از خشک شدن گسترش ها در هوا، با استفاده از میکروسکوپ بررسی گردیدند. در رنگ آمیزی ائوزین - نگرزین اسپرم های مرده به رنگ صورتی یا قرمز درآمده و اسپرم های زنده به علت جذب نکردن رنگ، سفید رنگ دیده می شوند. حداقل ۱۵۰ اسپرم از هر اسلاید (حداقل ۶۰۰ اسپرم از هر نمونه منی) بوسیله میکروسکوپ نوری (مدل: OLYMPUS BX41; Olympus Optical Co., Japan) ارزیابی شدند و با تفکیک اسپرم های مرده از کل اسپرم های شمارش شده هر نمونه منی، درصد اسپرم های زنده تعیین گردید. لازم به ذکر است برای ارزیابی مرفولوژیک اسپرم ها از رنگ آمیزی پاپانیکولا استفاده شد. به این شکل که اسپرم هایی که دارای ظاهر غیر طبیعی بودند، شمارش شدند و نتایج بر اساس درصد بیان شد (۱۸) و میزان اسپرم های با DNA آسیب دیده با استفاده از تکنیک رنگ آمیزی آکریدین

اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی تام: اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی تام منی به روش ferric reduction antioxidant power (FRAP) انجام شد. در این روش در pH اسیدی ایجاد شده توسط بافر استات، رنگ آبی تولید شده به واسطه احیای یونهای فریک (Fe<sup>3+</sup>) کمپلکس (2,4,6-) FeIII-TPTZ Tris(2-pyridyl)-s-triazine; Sigma-Aldrich; Cat: T1253) و تبدیل آنها به یونهای فرو (Fe<sup>2+</sup>)، در طول موج ۵۹۳ نانومتر و به صورت اسپکتروفوتومتریک مورد اندازه گیری قرار می گیرد. این واکنش غیر اختصاصی است و هر مولکولی که در شرایط فوق قابلیت احیای یون فریک را داشته باشد، در این واکنش شرکت می نماید (۲۱).

آنالیز آماری:

داده های حاصل از نمونه های مورد مطالعه، با کمک برنامه آماری SPSS نسخه ۱۷ تحت ویندوز (Inc., Chicago, IL, USA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تمامی پارامترهای مورد نظر با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) و آزمون t محاسبه شد. در تمام بررسی ها  $p < 0.05$  به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

#### یافته ها

تاثیر عصاره سیر بر پارامترهای منی: نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان دهنده کاهش معنی دار در تعداد اسپرم، میزان تحرک و زنده بودن اسپرم، اسپرم با مورفولوژی نرمال و اسپرم های با DNA آسیب دیده در گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل دارد ( $p < 0.05$ ). درمان با عصاره سیر سبب بهبود این پارامترها در مقایسه با موش های گروه دیابتی گردیده است ( $p < 0.05$ ). به طوری که در گروه درمانی با عصاره سیر  $400 \text{ mg/kg}$  تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشت (جدول ۱) ( $p > 0.05$ ).

اورنج طبق روش کاتایوز و همکاران تعیین گردید (۱۹). در انتها، نمونه ها توسط میکروسکوپ اپی فلورسنس (Model GS7, Nikon Co., Japan) با طول موج ۴۵۰-۴۹۰ نانومتر ارزیابی و تعداد ۱۰۰ تا ۲۰۰ اسپرم از هر اسلاید برای تعیین میزان اسپرم های با DNA آسیب دیده شمارش شد. اندازه گیری تستوسترون و نیتریک اکساید:

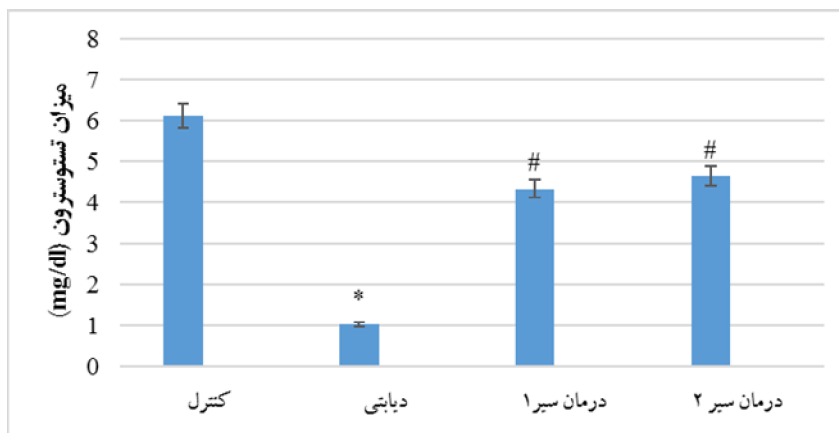
اندازه گیری میزان تستوسترون سرمی با استفاده از کیت اختصاصی (Diaplus, USA) به روش الایزا اندازه گیری گردید. برای سنجش میزان نیتریک اکساید بافت بیضه، ابتدا هموژن بافتی تهیه گردید. به این صورت که بافت بیضه را ابتدا وزن کرده و با بافر فسفات سالین ۵۰ میلی مولار  $\text{pH} = 7.4$  هموژن گردید. میزان تولید نیتریک اکساید توسط روش رنگ سنجی گریس (Griess) و استفاده از منحنی استاندارد نیتريت سدیم تعیین گردید. به طور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر از هموژن بافتی به صورت دوتایی به داخل چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای ته تخت ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱٪ سولفانیل آمید (sigma, USA) به چاهک ها اضافه گردید. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگهداری شد. آنگاه به تمام حفره ها ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول ۱٪ ۱-N-1-انفیل اتیلن دی آمید دی هیدرو کلراید (Sigma-USA) اضافه شد و بار دیگر به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگهداری گردید. در نهایت جذب نوری نمونه در طول موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه الایزانگار قرائت گردید. هم زمان با استفاده از غلظت های مختلف نیتريت سدیم منحنی استاندارد ترسیم گردید و از طریق رگرسیون و معادله خطی غلظت نیتريت نمونه ها تعیین گردید (۲۰).

جدول ۱: قابلیت زنده ماندن، تحرک، مورفولوژی، تمامیت DNA و شمارش اسپرم در مایع سمینال در گروه‌های تحت درمان و گروه کنترل

گروه کنترل	گروه دیابتی	گروه درمان با عصاره گیاه سیر ۲۰۰ mg/kg	گروه درمان با عصاره گیاه سیر ۴۰۰ mg/kg
میزان قابلیت زنده ماندن (%)	۶۷/۴ ± ۱/۶۴	۴۴/۷۸ ± ۲/۸۵ *	۵۸/۳۳ ± ۰/۴ #
تحرک (%)	۵۱/۹ ± ۵/۴	۳۲/۳ ± ۲/۴*	۴۱/۴ ± ۳/۲ #
مورفولوژی (%)	۷۹/۳۴ ± ۳/۱۴	۵۱/۷ ± ۶/۲۲*	۶۷/۶۳ ± ۰/۴۹ #
اسپرم با DNA آسیب دیده (%)	۸/۳۵ ± ۳/۴۴	۳۱/۸۴ ± ۲/۰۵*	۷/۴۸ ± ۰/۸۶ #
شمارش اسپرم (۱۰ <sup>۶</sup> )	۴/۰۸ ± ۰/۷۳	۲/۴۳ ± ۶/۱۴*	۳/۲۸ ± ۳/۴۹ #

( $p < 0.001$  \* بین گروه دیابتی و کنترل) ( $p < 0.05$  # بین گروه دریافت کننده دارو و گروه دیابتی) ( $p < 0.05$  \* بین گروه عصاره سیر ۲۰۰ و عصاره سیر ۴۰۰ mg/kg) (+ عدم وجود تفاوت معنی دار با گروه کنترل)

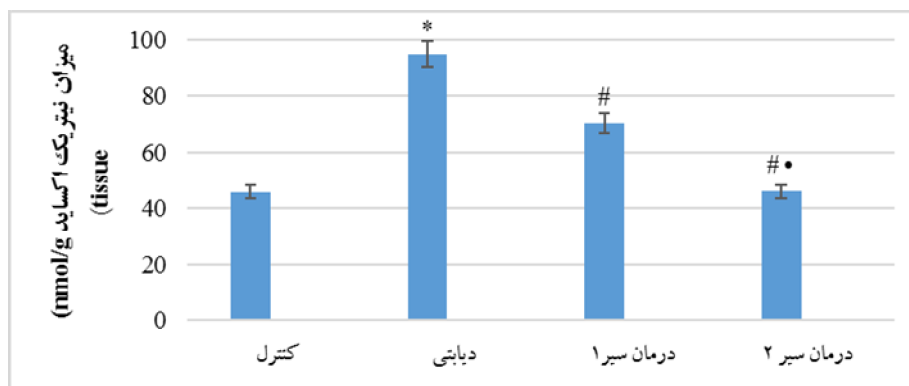
تأثیر عصاره سیر بر میزان تستوسترون سرم: در مطالعه حاضر STZ سبب کاهش میزان تستوسترون سرم در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد ( $p < 0.001$ ). در گروه های تحت درمان با سیر سطح تستوسترون در مقایسه با گروه دیابتی افزایش معنی داری یافت ( $p < 0.05$ ) (شکل ۱).



شکل ۱: تأثیر درمان با عصاره سیر بر میزان تستوسترون سرم ( $p < 0.001$  \* بین گروه دیابتی و کنترل) ( $p < 0.05$  # بین گروه دریافت کننده دارو و گروه دیابتی)، درمان سیر ۱: موش های دیابتی درمان شده با سیر ۲۰۰ mg/kg، درمان سیر ۲: موش های دیابتی درمان شده با سیر ۴۰۰ mg/kg

تأثیر عصاره سیر بر میزان نیتریک اکساید: میزان نیتریک اکساید بافت بیضه به عنوان یکی از مهمترین شاخص های موثر استرس اکسیداتیو مورد ارزیابی قرار گرفت. در گروه دیابتی میزان این شاخص به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. سیر توانست افزایش سطح نیتریک اکساید در موش های دیابتی را کاهش دهد ( $p < 0.001$ ) به طوری که در گروه درمانی با سیر ۴۰۰ mg/kg اختلاف معنی داری با گروه کنترل دیده نشد (شکل ۲).

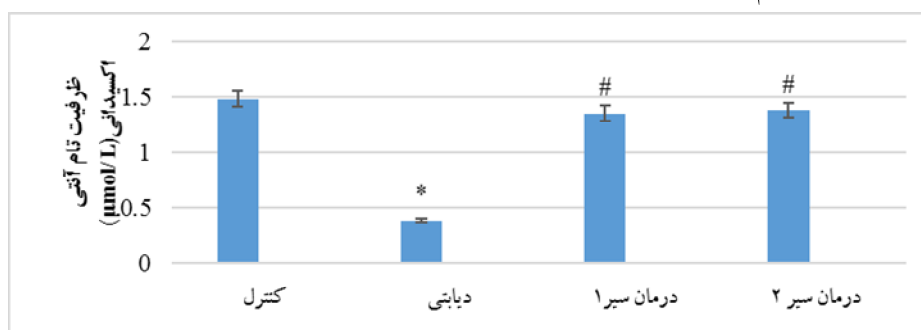
افزایش سطح نیتریک اکساید در موش های دیابتی را کاهش دهد ( $p < 0.001$ ) به طوری که در گروه درمانی با سیر ۴۰۰ mg/kg اختلاف معنی داری با گروه کنترل دیده نشد (شکل ۲).



شکل ۲: تاثیر درمان با عصاره سیر بر میزان نیتریک اکساید بافت بیضه ( $p < 0.05$  \* بین گروه دیابتی و کنترل) ( $p < 0.001$  # بین گروه دریافت کننده دارو و گروه دیابتی) (• عدم وجود اختلاف معنی دار بین گروه درمانی و گروه کنترل)  
 درمان سیر ۱: موش های دیابتی درمان شده با سیر ۲۰۰ mg/kg، درمان سیر ۲: موش های دیابتی درمان شده با سیر ۴۰۰ mg/kg

با سیر نیز توانست میزان TAC منی را در مقایسه با گروه دیابتی افزایش دهد ( $p < 0.05$ ) (شکل ۳).

تاثیر عصاره سیر بر ظرفیت تام آنتی اکسیدانی (TAC) منی: دیابت سبب کاهش معنی دار ظرفیت تام آنتی اکسیدانی منی در مقایسه با موش های سالم گردید ( $p < 0.05$ ). درمان



شکل ۳: تاثیر درمان با عصاره سیر بر ظرفیت تام آنتی اکسیدانی (TAC) منی ( $p < 0.05$  \* بین گروه دیابتی و کنترل) ( $p < 0.05$  # بین گروه دریافت کننده دارو و گروه دیابتی) درمان سیر ۱: موش های دیابتی درمان شده با سیر ۲۰۰ mg/kg، درمان سیر ۲: موش های دیابتی درمان شده با سیر ۴۰۰ mg/kg

شرایطی از قبیل التهاب می تواند به حدی افزایش یابد که بر سیستم دفاع ذاتی آنتی اکسیدانی بدن غلبه نماید. استرس اکسیداتیو در بیماران دیابتی نیز با تولید بیش از حد رادیکال های آزاد اکسیژن و نیترژن از جمله نیتریک اکساید منجر به کاهش دفاع آنتی اکسیدان می شود و در نتیجه منجر به تخریب اجزاء حیاتی سلول از قبیل لیپید، پروتئین و DNA می گردد (۲۰). اکسیداسیون لیپیدها، پروتئین ها و بویژه DNA نیز در طول گسترش دیابت اتفاق می افتد (۲۳).

## بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره هیدروالکلی سیر می تواند سبب بهبود پارامترهای منی و افزایش سطح آنتی اکسیدان کاهش سطح استرس اکسیداتیو در سطح اسپرم در گروه های دیابتی درمان شده با سیر گردید. در مطالعات مختلف مشاهده شده است، افزایش غلظت گونه های واکنش پذیر اکسیژن (ROS) و یا نیترژن (سوپراکساید، نیتریک اکساید، پراکسی نیتریت) در

جهش در DNA میتوکندریایی نیز در سایر بافت های دیابتی گزارش شده که خود نوعی استرس اکسیداتیو وابسته به آسیب میتوکندریایی است (۲۳).

استریتوزوتوسین (STZ) در ابتدا به عنوان یک آنتی بیوتیک مطرح شد ولی استفاده چندانی به عنوان آنتی بیوتیک نشد. STZ سبب نابودی سلول های  $\beta$  جزایر لانگرهانس پانکراس شده و بطور گسترده برای ایجاد دیابت نوع ۱ در حیوانات به عنوان مدل مشابه انسانی و بررسی روند ایجاد دیابت و آزمودن روش های درمانی جدید دیابت مورد استفاده قرار می گیرد (۲۴). به همین دلیل در این مطالعه نیز از استریتوزوتوسین برای القاء دیابت در موش استفاده گردید.

سلول های اسپرم پستانداران دارای محتوای لیپیدی با مقادیر زیادی از اسیدهای چرب غیراشباع، پلاسمالوژن ها و اسفنگومیلین می باشد و لیپیدهای موجود در اسپرماتوزوآ، ماده اصلی برای عمل پراکسیداسیون می باشند (۳). این ویژگی بافت بیضه را به کانونی مناسب برای تولید رادیکال های آزاد ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها در طی دیابت تبدیل می کند. به علاوه سلول ها در این بافت به طور مکرر در حال تقسیم بوده، تولید رادیکال های آزاد در آنها به شدت افزایش می یابد. کاهش دفاع آنتی اکسیدان نیز در طی دیابت منجر به تشدید تجمع رادیکال های آزاد می گردد. رادیکال های آزاد ایجاد شده از مسیرهای متفاوت درون سلولی بر فعالیت های سلول اثر گذاشته و آپوپتوز و تخریب بافتی در بیضه ها را تشدید می کند (۲۵).

بالستر و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که دیابت می تواند بر روند اسپرماتوزنر تاثیر گذارد و موجب تغییرات چشمگیر و دژنره شدن سلول های زایا در مراحل مختلف تکوین می شود (۲۲). در مطالعه ای که منگولی و همکاران بر روی موش سوری انجام دادند نشان دادند که پارامترهای منی در موش های دیابتی بطور معنی داری دارای کیفیت پایینتری نسبت به گروه کنترل هستند (۲۶). یکی دیگر از پارامترهایی که در اسپرم موش های دیابتی و موش های

سالم تفاوت داشته است کیفیت کروماتین اسپرم می باشد (۲۷). همچنین در مطالعه ای که انجام شده است، نشان داده شده است که دیابت آثار زیانباری بر روی یکپارچگی DNA در اسپرم دارد و دیابت ملیتوس می تواند سبب تغییرات در کمیت و کیفیت کروماتین و افزایش قطعه قطعه شدن DNA اسپرم شود (۲۶). در بررسی های انجام شده با رنگ آمیزی آکریدین اورنج نشان داده شده است که دیابت سبب افزایش دناتوره شدن DNA در اسپرم می شود (۲۷). نتایج حاصل از این مطالعه در خصوص اثرات زیانبار دیابت بر سیستم تولیدمثل دام نر، نیز موید مطالعات فوق (۲۷-۲۲) بوده و نشان داده شد که دیابت سبب کاهش کیفیت پارامترهای منی در موش ها گردید.

کاهش سطح هورمون اصلی آندروژنیک یعنی تستوسترون در موش های دیابتی نشان داده شده است (۲۸). در این مطالعه نیز سطح تستوسترون سرم موش های دیابتی کاهش یافت. درمان با سیر توانست کاهش سطح این هورمون را بهبود ببخشد. همانطور که گفته شد دیابت بدلیل افزایش رادیکال های آزاد و استرس اکسیداتیو، می تواند سبب افزایش تولید نیتریک اکساید و کاهش سطح سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) می شود (۲۹). افزایش تولید نیتریک اکساید می تواند سبب تغییر مقادیر هورمون های جنسی، آسیب بیضه و سایر آسیب های تولیدمثلی در موش های صحرایی می گردد (۳۰).

عصاره سیر بدلیل دارا بودن مواد مختلف آنتی اکسیدانی، به عنوان یک ماده خوراکی با فعالیت آنتی اکسیدانی بالا توانسته است در بسیاری از بیماری ها بهبودی ایجاد نماید (۳۱). فعالیت آنتی اکسیدانی سیر، هم در آزمایشگاه و هم در موجودات زنده به اثبات رسیده است (۳۲). در مطالعه ای نشان دادند که سیر می تواند سبب بهبود وضعیت سطح پراکسیداسیون چربی (MDA)، سوپراکسیددیسموتاز ، گلوکاتایون پراکسیداز و سطح تام آنتی اکسیدانی (TAS) در مقایسه با کلرید کروم (CrCl<sub>3</sub>) در موش های صحرایی

میرفردی و جوهری در سال ۲۰۱۵ بر روی موش های تحت درمان با سیکلوفسفامید انجام داده بودند، آنها نشان دادند که با افزایش دوز تاثیر عصاره سیر افزایش می یابد (۳۷). همچنین در مطالعه ای دیگر نشان داده شده است که افزایش دوز مصرف عصاره سیر می تواند سبب بهبود پارامترهای منی و بهبود وضعیت آنتی اکسیدانی در موش های صحرایی گردد (۳۸). در مطالعه حاضر نیز عصاره سیر توانست سبب کاهش استرس اکسیداتیو در بیضه و در نتیجه سبب بهبود آسیب های ناشی از دیابت در بیضه گردد.

### نتیجه گیری

در مجموع این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی سیر به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی می تواند بافت بیضه را در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت تیپ ۱ محافظت کند.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از زحمات شایان توجه جناب آقای مهندس علی یاری و بخش مامایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، که در انجام این تحقیق، ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی نمایند.

گردد (۳۳). همچنین گزارش شده است که خوراندن عصاره سیر به موش های صحرایی نردیابتیک به مدت یک و نیم ماه، وزن اپی دیدیم و سیمینال وزیکول را نسبت به موش های دیابتیک افزایش داده است (۳۴). Hfaiedh و همکاران (۳۵) نشان دادند سیر سبب بهبود استرس اکسیداتیو حاصل از Lindane از جمله افزایش سطح کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز و آلکالین فسفاتاز و گلوکاتایون ترانسفراز در بیضه می گردد و پارامتر های منی را بهبود می بخشد. همچنین سیر باعث افزایش آنزیم های کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز و کاهش سطح پراکسیداسیون چربی (MDA) در بیضه موش های صحرایی دیابتی گردید (۳۶).

در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد، که درمان با دوزهای مختلف عصاره سیر، سبب بهبود پارامترهای منی در موش های دیابتی می گردد، که با افزایش دوز این اثرات افزایش می یافت، به طوری که در گروه درمانی با عصاره سیر ۴۰۰ mg/kg تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشت. همچنین در این مطالعه استفاده از عصاره سیر با افزایش دوز سبب کاهش سطح نیتریک اکساید و افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی تام گردید. که این مطالعه مؤید مطالعه ای بود که

### References

- Guyton & Hall. Medical physiology. 12th ed. Sepehri H, Rastkar A, Ghasemi K. Andishe rafia pub, 2011; 1194. [In Persian]
- Pop-Busui R, Sima A, Stevens M. Diabetic neuropathy and oxidative stress. Diabetes Metab Res Rev 2006; 22: 257-73.
- Amaral S, Moreno AJ, Santos MS, Seiça 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: 2056-67.
- 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; 1; 29: 482-8.
- Ning G, Hong J, Bi Y, Gu W, Zhang Y, Zhang Z, et al. Progress in diabetes research in China J Diabetes 2009; 1: 163-72.
- Soudamani S, Yuvaraj S, Rengarajan S, Sivakumar R, Malini T, Balasubramanian K. Effects of streptozotocind diabetes and insulin replacement on androgen and estrogen receptor concentrations in the epididymis of Wistar rats. Journal of Endocrinology and Reproduction (JER) 2006;10:59-61.

7. Arikawe AP, Daramola AO, Odofin AO, Obika LF. Alloxan-induced and insulin-resistant diabetes mellitus affect semen parameters and impair spermatogenesis in male rats. *Afr J Reprod Health* 2006;10:106-13.
8. Abdollah nejad A, Gol A, Dabiri Sh, Javadi AR. Effect of garlic on testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Iran J Endocrinol Metab* 2010; 11: 443-53. [In Persian]
9. Kim ST, Moley KH. Paternal effect on embryo quality in diabetic mice is related to poor sperm quality and associated with decreased glucose transporter expression. *Reproduction* 2008; 136: 313-22.
10. Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Goran A, Igetic R. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chem* 2008; 111: 925-9.
11. Corzo-Martínez M, Corzo N, Villamiel M. Biological properties of onions and garlic. *Trends Food Sci Technol* 2007; 18: 609-25.
12. Guneli E, Tugyan K, Ozturk H, Gumustekin M, Cilaker S, Uysal N. Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Eur Surg Res* 2008; 40: 354-60.
13. Shiju TM, Rajesh NG, Viswanathan P. Renoprotective effect of aged garlic extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian J Pharmacol* 2013; 1: 45:18.
14. Eidi A, Eidi M, Esmaeili E. Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine* 2006; 24: 624-9.
15. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 3rd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1992; 45-100.
16. Agarwal A, Makker K, Sharma R. Review article: clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59:2-11.
17. Wyrobek AJ, Gordon LA, Burkhart JG, Francis MW, Kapp RW, Letz G, et al. An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals. *Mutat Res* 1983; 115:1-72.
18. Narayana K, D'Souza UJ, Rao KS. Ribavirin-induced sperm shape abnormalities in Wistar rat. *Mutat Res* 2002; 513: 193-6.
19. Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 2004; 19: 1401-8.
20. Guevara I, Iwanejko J, Dembińska-Kieć A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta* 1998;247: 177-88.
21. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 1999; 299:15-27.
22. Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev* 2008; 1:15-24.
23. Barrera G, Pizzimenti S, Dianzani MU. Lipid peroxidation: control of cell proliferation, cell differentiation and cell death. *Mol Aspects Med* 2008; 29:1-8.
24. Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol* 2015; 1:5-47.
25. Liu J, Shen W, Zhao B, Wang Y, Wertz K, Weber P, et al. Targeting mitochondrial biogenesis for preventing and treating insulin resistance in diabetes and obesity: Hope from natural mitochondrial nutrients. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61:1343-52.

26. Mangoli E, Talebi AR, Anvari M, Pouretezari M. Effects of experimentally-induced diabetes on sperm parameters and chromatin quality in mice. *Iran J Reprod Med* 2013; 11:53-60.
27. Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C, et al. Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Hum Reprod* 2007; 22: 1871-7.
28. Roy S, Metya SK, Rahaman N, Sannigrahi S, Ahmed F. Ferulic acid in the treatment of post-diabetes testicular damage: relevance to the down regulation of apoptosis correlates with antioxidant status via modulation of TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$  and Akt signalling. *Cell Biochem Funct* 2014; 32:115-24.
29. Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840: 2709-29.
30. Ahmed MA, Kurkar A. Effects of opioid (tramadol) treatment on testicular functions in adult male rats: The role of nitric oxide and oxidative stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2014; 41: 317-23.
31. Khajehdehi P. Turmeric: Reemerging of a neglected Asian traditional remedy. *J Nephrothol* 2012;1:17-22.
32. Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Olivares-Corichi IM, de los Angeles Granados-Silvestre M, Hernandez-Pando R, et al. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med* 2000; 29:602-11.
33. Ghalehkandi JG. Garlic (*Allium sativum*) juice protects from semen oxidative stress in male rats exposed to chromium chloride. *Anim Reprod* 2014; 11: 526-32.
34. Abdolahnejad A, Gol A, Dabiri SH, Javadi AR. Preventive and therapeutic role of garlic on the epididymis and seminal vesicle of male diabetic rats. *Bimonthly J Hormozgan Uni Med Sci* 2010; 14:98-108.
35. Hfaiedh N, Murat JC, Elfeki A. Protective effects of garlic (*Allium sativum*) extract upon lindane-induced oxidative stress and related damages in testes and brain of male rats. *Pesticide Biochem Physiol* 2011; 100: 187-92.
36. Salimnejad R, Jalali M, Nikravesh MR, Fazel AR. Effect of Garlic Aqueous Extract on Markers of Oxidative Stress in Diabetic Rats Testes. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences* 2014; 13: 371-82. [In Persian]
37. Mirfardi M, Johari H. The Effect of Hydro-Alcoholic *Allium sativum* Extract on Sexual Hormones in Mature Male Rats under Chemotherapy with Cyclophosphamide. *Zahedan J Res Med Sci* 2015; 17: 29-33
38. Hosseini N, Khaki A. Effect of Aqueous Extract Of Garlic (*Allium Sativum*) on sperms morphology, motility, concentration and its antioxidant activity in rats. *Afinidad* 2014; 80: 201-4.