



بررسی تأثیر پروپرتوکیک‌های لاكتو باسیلوس کازئی و بیفیدو باکتریوم لакتیس بر بلوغ اسپرم در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

سمیرا عباسی (MSc)^{*1}، زهرا کشتمند (PhD)^{**1}

¹ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

(دریافت مقاله: ۹۸/۴/۱۰ - پذیرش مقاله: ۹۸/۷/۳۰)

چکیده

زمینه: دیابت از بیماری‌های دارای شیوع بالا در جهان، که دارای عوارض جانبی از جمله در بخش‌های تولید مثلی است. پروپرتوکیک‌ها میکروگانیسم‌های مفید، اثرات پیشگیرانه و درمانی در بیماری‌ها دارند. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر پروپرتوکیک‌های لاكتو باسیلوس کازئی و بیفیدو باکتریوم لакتیس بر بلوغ اسپرم در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۳۵ سر موش صحرایی ویستار نر به پنج گروه کنترل، دیابتی، گروه‌های دیابتی تیمار با پروپرتوکیک لاكتو باسیلوس کازئی و بیفیدو باکتریوم لакتیس و مخلوطی از هر دو پروپرتوکیک تقسیم‌بندی شدند. گروه‌های دیابتی (نوع ۱) با تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین با دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دیابتی شدند و تیمار با پروپرتوکیک‌ها به مدت ۳۵ روز انجام شد. در پایان دوره تیمار، سطح گلوكز خون، وزن اپیدیدیم و بلوغ اسپرم، مورد بررسی و درصد جایگزین هیستون-پروتامین با رنگ‌آمیزی آنلین بلو ارزیابی شد.

یافته‌ها: در مطالعه حاضر میزان گلوكز خون در گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار داشته ($P < 0.001$). در حالی‌که در گروه‌های تیمار شده با لاكتو باسیلوس کازئی و بیفیدو باکتریوم لакتیس در مقایسه با گروه دیابتی کاهش معنی‌دار را نشان داد ($P < 0.001$). در موش‌های دیابتی در مقایسه با گروه کنترل درصد اسپرم نابالغ به‌طور معنی‌دار افزایش ($P < 0.001$) و در گروه‌های تیمار با پروپرتوکیک‌ها در مقایسه با گروه دیابتی افزایش معنادار نشان داده شد ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: پروپرتوکیک‌های لاكتو باسیلوس کازئی و بیفیدو باکتریوم لакتیس بر کاهش گلوكز خون و درصد بلوغ اسپرم در موش‌های صحرایی دیابتی تأثیر مثبت دارد.

واژگان کلیدی: استرپتوزوتوسین، دیابت، لاكتو باسیلوس کازئی، بیفیدو باکتریوم لакتیس، موش صحرایی نر

*تهران، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

Email: zkeshtmand2001@gmail.com

*ORCID: 0000-0001-8312-3193

**ORCID: 0000-0002-9759-1446

مقدمه

از شایع ترین بیماری های غدد درون ریز که شیوع آن در جوامع بشری در حال افزایش است دیابت می باشد. این بیماری طیفی از بیماری های متابولیک را شامل شده که از آن جمله افزایش قند و اختلال متابولیسم در کربوهیدرات ها، لیپیدها و پروتئین ها می باشد (۱). دو علت شایع ایجاد کننده دیابت افزایش میزان انسولین و دیگری مقاومت گیرنده به انسولین می باشد. عوارض جانبی دیابت می توان به اختلال در عملکرد کلیه، نوروپاتی، بیماری های قلبی - عروقی و اختلال در دستگاه تولید مثل اشاره کرد (۱ و ۲). استرس اکسیداتیو و اختلالات لیپیدی از جمله فاکتور های پیش برنده این بیماری می باشد (۲).

یکی از مکانیسم های درگیر در بیماری دیابت استرس اکسیداتیو می باشد. استرس اکسیداتیو علاوه بر افزایش مقاومت به انسولین و تشدید دیابت، نقش مهمی را نیز در پاتوژن عوارض و تشدید پیامدهای بعدی دیابت دارد (۳). با توجه به نقش استرس اکسیداتیو در پیشرفت بیماری دیابت در شرایط آزمایشگاهی و در مدل های حیوانی از داروی استرپتو佐 تو سین با دوز های خاص برای القا دیابت استفاده می شود (۴ و ۵).

ایجاد دیابت تجربی در موش های صحرایی با کمک استرپتو佐 تو سین (STZ) به عنوان مدلی برای مطالعه اثرات دیابت بر دستگاه های مختلف مورد استفاده قرار می گیرد (۶ و ۷). ثابت شده است که تغییرات ساختاری در بافت بیضه موش های صحرایی دیابتی شده توسط STZ مربوط به اثرات جانبی این ترکیب نمی باشد بلکه اثرات دیابت بر عملکرد بیضه به دلیل تولید ناکافی انسولین و متعاقباً کاهش اثر این هورمون در تنظیم فعالیت سلول های سرتولی و لیدیگ می باشد (۸ و ۹).

مکانیسم عملکرد استرپتو佐 تو سین به این صورت است که از طریق ناقل گلوکز وارد سلول های بتا پانکراس شده و از طریق الكلیه کردن مولکول DNA و تشکیل رادیکال های آزاد سبب تولید استرس اکسیداتیو می شود. از سوی دیگر استرپتو佐 تو سین میزان آزاد شدن نیتریک اکساید را که سبب تخریب DNA می شود را افزایش داده و با تخریب سلول های بتا پانکراس سبب القا دیابت می گردد (۱۰). دیابت از طریق چندین مسیر در جنس نر منجر به ایجاد اختلال در سیستم تولید مثلی، کاهش ناباروری و یا حتی عدم ناباروری می شود و پژوهش های مختلف نشان داده است که کاهش باروری به خاطر ایجاد اختلال در دستگاه تولید مثلی می باشد (۱۱). دیابت، سبب ایجاد استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی در اندام های جنسی از جمله بیضه و اپیدیدیم می شود. استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت، با مشکلات عروقی، اختلال در اندوتیالی و نوروپاتی در بافت نعروطی ارتباط دارد. در بیماران دیابتی بالا بودن قندخون به طور مزمن به علت گلیکوزیلاسیون و پراکسیداسیون باعث افزایش استرس اکسیداتیو و در نتیجه تغییر در ساختار و عملکرد پروتئین ها و لیپیدها می گردد. پراکسیداسیون لیپید منجر به تولید آلدیدهای سمی می شود که این ترکیبات بر اندام های جنسی و سلول جنسی اثر تخریبی داشته و سبب افزایش ناباروری می شود (۱۲ و ۱۳).

همچنین، در افراد دیابتی افزایش سطوح رادیکال های آزاد و کاهش همزمان مکانیسم های دفاعی در برابر آن می تواند منجر به صدمه بافت ها و آنزیم ها شده، پراکسیداسیون لیپیدی و مقاومت به انسولین را افزایش دهد (۱۴). از این رو استفاده از عوامل آنتی اکسیدان نقش بهسزایی در کاهش اثرات جانبی ناشی از بیماری دیابت خواهد داشت (۱۵ و ۱۶).

گروه‌بندی موش‌ها

موش‌ها به صورت تصادفی به ۵ گروه ۶ تابی تقسیم‌بندی شدند.

گروه اول (گروه کنترل): موش‌هایی که هیچ دارویی به آن‌ها داده نشد و فقط آب و غذا تغذیه شدند.

گروه دوم: موش‌هایی که به آن‌ها دارو استرپتوزوتوسین به صورت تک دوز به مقدار ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و درون صفاقی تزریق شد.

گروه سوم: موش‌هایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین که به مدت ۳۵ روز پروپیوتیک لاکتوپاسیلوس کازئی با دوز ۱۰^۹ (واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر) آن‌ها گاواظ گردید.

گروه چهارم: موش‌هایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین، که به مدت ۳۰ روز پروپیوتیک بیفیدوپاکتریوم لاکتیس با دوز ۱۰^۹ (واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر) آن‌ها گاواظ گردید.

گروه پنجم: موش‌هایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین که به مدت ۳۵ روز مخلوطی از پروپیوتیک‌های لاکتوپاسیلوس کازئی و بیفیدوپاکتریوم لاکتیس با دوز ۱۰^۹ (واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر) آن‌ها گاواظ گردید. هر بار قبل از شروع آزمایش حیوان‌ها وزن گردیده و قند خون آن‌ها توسط دستگاه تست قند خون و با بریدن جزئی انتهای دم آن‌ها اندازه‌گیری و یادداشت گردید. موش‌ها در قفس‌های فلزی و در هر قفس ۲ سر موش نگهداری شد. تمامی موش‌ها دسترسی بدون محدودیت به آب و غذا داشتند.

تزریق دارو و تعیین دوز

داروی استرپتوزوتوسین به صورت پودری از شرکت سیگما خریداری شد و با توجه به وزن بدن موش‌ها و القا دیابت، دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از داروی استرپتوزوتوسین به صورت تک دوز و درون صفاقی

پژوهش‌ها نشان داده است که پروپیوتیک به عنوان یک آنتی زن منجر به تحریک سیستم ترشح آنزیم‌های آنتی اکسیدان گردید و با افزایش ترشح آنتی اکسیدان منجر به حذف رادیکال‌های آزاد گردید و با تنظیم تعادل رادیکال‌های آزاد بدن، بافت و اندام‌های آسیب دیده بدن ترمیم شدند.

پروپیوتیک‌ها (Probiotic) میکروارگانیسم‌های بی‌ضرر که در صورت مصرف کافی، علاوه بر فواید تغذیه‌ای، دارای فواید بهداشتی نیز می‌باشند (۱۷). در سال‌های اخیر، مطالعات انجام شده نشان داده است که استفاده از پروپیوتیک‌ها در پیشگیری، کنترل و حتی درمان بیماری‌های مختلف اثرگذار است (۱۸ و ۱۹).

با توجه به اهمیت پروپیوتیک و شیوع دیابت و مطالعات اندک در این حوزه هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر پروپیوتیک‌های لاکتوپاسیلوس کازئی و بیفیدوپاکتریوم لاکتیس بر میزان قندخون و بلوغ اسپرم در موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوان آزمایشگاه

در این مطالعه تجربی تعداد ۳۰ سرموش بالغ نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم، از مؤسسه تحقیقاتی انتیتو پاستور خریداری و به منظور سازگار شدن با شرایط محیط، به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایش در حیوان‌خانه، تحت شرایط آزمایشگاهی و در دمای ۲۰±۲ و در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. در این پژوهش کلیه ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های کار روی حیوانات آزمایشگاهی مورد اجرا قرار گرفت و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی مطابق با راهنمای انتیتوی ملی سلامت انجام شده است.

سوسپانسیون اسپرم، تهیه و اجازه داده شد تا در مقابل هوای خشک شود (۲۲).

رنگ آمیزی آنیلین بلو

برای بررسی درصد جایگزینی هیستون با پروتامین اسپرم، گسترش‌ها به وسیله آنیلین بلو (AB) رنگ آمیزی انجام شدند (۲۳). گسترش‌های اسپرم تهیه شده، به مدت ۵ دقیقه در محلول فرمالین ۴ درصد ثابت شدند. لامها، پس از شستشو با آب، در محلول آنیلین بلو (آنیلین بلو ۵ درصد در اسیداستیک ۴ درصد $pH=3/5$) به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شدند. پس از شستشو، با آب به مدت یک دقیقه لامها در اثوزین ۵ درصد قرار گرفتند و مجدد با آب، شسته و در مجاورت هوای خشک شدند.

لامها با استفاده از میکروسکوپ نوری و ابژکتیو $\times 40$ بررسی گردیدند. اسپرم‌ها با توجه به میزان رنگ‌پذیری در دو گروه بررسی شدند اسپرم‌های نابالغ با پروتئین‌های هیستون هسته‌ای (غنى از لизين) به رنگ آبي تيره و اسپرم‌های بالغ با پروتامين‌ها (غنى از سيستين و آرزنين) به رنگ آبي کمرنگ مشاهده مي شوند.

تجزیه و تحلیل آماری

با استفاده از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف از نرمال بودن داده‌ها اطمینان حاصل و داده‌ها به دست آمده، توسط نرمافزار SPSS ویرایش ۱۹ و با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس یکطرفه، (One way ANOVA) و آزمون متعاقب Tukey مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. یافته‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار بیان و سطح معنی‌داری آزمون‌ها $0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که، در موش‌های صحرایی دیابتی شده میزان قندخون نسبت به

حيوان تزریق گردید (۱۰). جهت بررسی دیابتی شدن موش‌ها در روز سوم، پنجم و هفتم و چهاردهم قندخون آن‌ها اندازه‌گیری شد. برای گرفتن قندخون باید موش‌ها قبل آزمایش به مدت ۸ ساعت ناشتا باشند. گلوکز خون بالاتر از ۲۵۰ (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) ملک دیابتی در نظر گرفته شد (۲۰).

روش تهیه و آماده‌سازی پروبیوتیک

در این مطالعه دو نوع پروبیوتیک لاکتو باسیلوس کائزی (ATCC-۳۹۳۹۲) و بیفیدوباکتریوم لاکتیس (Bb-۱۲) از شرکت تک ژن و به صورت پودری تهیه گردید. برای تهیه محلول به ازای هر موش $0/1$ گرم از پروبیوتیک در ۹ سی‌سی آب مقطّر حل شد (۲۱).

تشريح موش و تعیین وزن و اپیدیدیم
پس از دوره تیمار، موش‌ها در حالت ناشتا گذاشته شده، وزن و قندخون آن‌ها اندازه‌گیری و یادداشت شد. سپس بعد از بیهوشی با کلروفرم باز کردن ناحیه صفاقی از طریق شکاف عرضی - شکمی، اپیدیدیم آن خارج کرده و پس از جدا کردن با ترازوی دیجیتال وزن موش و اپیدیدیم گرفته شد.

بررسی بلوغ اسپرم

بدین منظور بافت اپیدیدیم چپ (ناحیه دم) را جدا کرده و در پتری دیش حاوی 5 میلی‌لیتر محیط کشت FBS محتوای DMEM/F12 5 درصد که به منظور تبادل CO_2 ، 24 ساعت قبل از استفاده در انکوباتور حاوی CO_2 قرار داده شده و توسط تیغ بیستوری خرد گردید، سپس به منظور رها شدن اسپرم‌ها، پتری دیش را به مدت 20 دقیقه، در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. از حجم تهیه شده برای بررسی بلوغ اسپرم استفاده شد. سپس گسترش نازکی از

علاوه بر این، رنگ‌آمیزی گسترش‌های اسپرمی با آنلین‌بلو، بیانگر این بود، که موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین در مقایسه با گروه کنترل، درصد جایگزینی هیستون با پروتامین به صورت معنی‌داری در آن‌ها افزایش و برعکس، نمونه‌های دیابتی تیمار شده با لاکتوپاسیلوس کازئی و بیفیدوپاکتریوم لاکتیس درصد جایگزینی هیستون با پروتامین کاهش معنی‌داری را نشان داد (جدول ۱).

در گروه دیابتی تیمار شده با مخلوط هر دو پروپیوتیک لاکتوپاسیلوس کازئی و بیفیدوپاکتریوم لاکتیس کاهش گلوکز خون، افزایش وزن اپیدیدیم و کاهش درصد جایگزینی هیستون با پروتامین در مقایسه با گروه دیابتی نشان داده شده اما این تغییرات اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت. در موش‌های صحرایی دیابتی تیمار شده با پروپیوتیک‌های لاکتوپاسیلوس کازئی و لاکتیس کاهش سطح گلوکز خون در مقایسه با گروه دیابتی نشان داده شد ($P=0.34$) در حالی‌که سطح گلوکز خون در گروه‌های دیابتی تیمار شده با پروپیوتیک‌های ذکر شده بیشتر از گروه کنترل مشاهده گردید ($P<0.001$) (جدول ۱). همچنین برای هر موش وزن اپیدیدیم در پایان دوره تیمار اندازه‌گیری شد که نتایج نشان می‌دهد وزن اپیدیدیم در گروه دریافت کننده استرپتوزوتوسین در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته، این درحالی است که وزن اپیدیدیم در گروه‌های دریافت کننده پروپیوتیک لاکتوپاسیلوس کازئی و بیفیدوپاکتریوم لاکتیس و هر دو پروپیوتیک در مقایسه با گروه دیابتی افزایش داشته و این افزایش اختلاف معنی‌داری در میانگین وزن اپیدیدیم در بین گروه‌های مختلف را نشان داد (جدول ۱).

جدول ۱) تاثیر داروی استرپتوزوتوسین و پروپیوتیک‌های لاکتوپاسیلوس کازئی و بیفیدوپاکتریوم لاکتیس بر سطح گلوکز خون و وزن اپیدیدیم در موش صحرایی نژاد ویستار

گروه	سطح گلوکز خون (mg/dl)	وزن اپیدیدیم (گرم)	جایگزینی هیستون با پروتامین	درصد
کنترل	۱۲/۸۸±۰/۹۳	۰/۳۵±۰/۰۲۸	۱۲۰/۳۲±۲۵/۸۳	
دیابتی شده	###۱۴/۶۳±۱/۶۳	۰/۲۳±۰/۰۶	###۶۰۶/۲۵±۳۲/۴۶	
دیابتی شده+دریافت کننده بیفیدوپاکتریوم لاکتیس	###۱۳/۰۶±۰/۷۶	# α ۰/۲۸±۰/۰۱	#۰۳۷۷/۷۵±۳۲/۸۷	
دیابتی شده+دریافت کننده لاکتوپاسیلوس کازئی	###۱۳/۱۷±۱/۱۱	# β ۰/۲۷±۰/۰۱۲	#۴۶۶/۱۲±۳۳/۲۰	
دیابتی شده+دریافت کننده بیفیدوپاکتریوم لاکتیس+لاکتوپاسیلوس کازئی	###۱۳/۲۳±۱/۱۶	# ۰/۲۵±۰/۰۳۷	#۵۸۵/۱۲±۴۴/۳۷	

مقادیر براساس میانگین \pm خطای معیار میانگین آورده شده است.
علامت # نشان‌دهنده سطح اختلاف معنی‌دار $P<0.05$ با گروه کنترل
علامت α نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار $P<0.05$ در مقایسه با گروه دیابتی.

لاکتیس سبب کاهش قندخون و افزایش درصد بلوغ اسپرم در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین می‌گردد.

بحث

نتایج به دست آمده از این تحقیق، نشان داد که پروپیوتیک‌های لاکتوپاسیلوس کازئی و بیفیدوپاکتریوم

پلاسماء، گلوكز، تری گلیسیرید و بهبود سطح مقاومت به انسولین در موش **KKAY** می‌شود (۲۳). همچنین جعفری و همکاران، در پژوهش خود اثر ضد دیابتی باکتری لاکتوبراسیلوس کازئی بر میزان قندخون در موش‌های نر دیابتی را نشان دادند (۲۶).

تنظیم قندخون به عنوان یک عامل بسیار مهم در کاهش پراکسیداسیون لپیدی در بیماران دیابتی می‌باشد از این رو جلوگیری از تشکیل پراکسیداسیون لپیدی باعث کاهش پیشرفت دیابت و عوارض ناشی از آن می‌شود (۲۷). افزایش تولید رادیکال‌های آزاد سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی شده که این خود باعث اکسید شدن و سپس دناטורه شدن آنزیم می‌شود و یا اینکه این کاهش فعالیت در نتیجه‌ی هایپرگلایسمی طولانی مدت و گلیکوزیلاسیون آنزیمی اتفاق افتد و منجر به مهار فعالیت آنزیم شود (۲۸). احتمال می‌رود که پروپیوتیک‌ها از طریق مکانیسم‌های یاد شده، با کاهش سطح قندخون باعث کاهش تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش سطح استرس اکسیداتیو در افراد دیابتی می‌شود. پژوهش‌ها نشان داده است که پروپیوتیک‌ها به طور معنی‌داری پراکسیداسیون لپیدی و تشکیل نیتریک اکساید را در بافت پانکراس مهار کرده و از این طریق آسیب اکسیداتیو ایجاد شده را کاهش و مقابله آنتی اکسیدان‌ها از قبیل گلوتاتیون، گلوتاتیون پراکسیداز و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را افزایش می‌دهند. همچنین کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از مصرف پروپیوتیک‌ها به دلیل اثر آن‌ها بر افزایش سطح گلوتاتیون احیا شده و مهار رادیکال‌های هیدروکسیل و سوپراکسید می‌باشد (۲۵).

نتایج تحقیق حاضر در مورد درصد اسپرم‌های نابلغ افزایش معنی‌دار آن را تحت تأثیر استرپتوزوتوسین در مقایسه با سایر گروه‌ها نشان می‌دهد. در مرحله‌ی

پروپیوتیک‌های لاکتوبراسیلوس کازئی و اسیدوفیلوس در موش‌های دیابتی شده با فروکتوز اثرات ضد دیابتی داشته و مشاهده گردید که پروپیوتیک‌های استفاده شده در مطالعه سبب کاهش قندخون و عدم تحمل گلوكز می‌شود. یاداو (Yadav) و همکاران، تأثیر محصول پروپیوتیکی که ترکیبی از پروپیوتیک‌های لاکتوبراسیلوس کازئی و لاکتوبراسیلوس را در موش‌های دیابتی نشان دادند. تأثیر این پروپیوتیک‌ها در موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین را مربوط به توانایی پروپیوتیک‌ها در تقویت سیستم آنتی اکسیدانتی و کاهش آسیب‌های سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس دانستند. همچنین در مطالعات دیگر نیز به نقش مؤثر پروپیوتیک‌ها در کاهش قندخون اشاره شده است. بررسی‌های انجام شده روی سویه‌های مختلف پروپیوتیک از جمله لاکتوبراسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوبراسیلوس کازئی، لاکتوبراسیلوس اسیدوفیلوس و بیفلوپاکتربیوم کازئی و لاکتوبراسیلوس رامنوس و لاکتوبراسیلوس) نشان داده شده است که سطح سرمی قند خون در گروه‌های مورد مداخله بالاکتوبراسیلوس‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش می‌باید (۲۴). نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز هم راستا با پژوهش‌های پیشین می‌باشد. همچنین مطالعه دیگر نشان داد که تخریب سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین تیمار شده با پروپیوتیک در مقایسه با گروه دیابتی کاهش معنی‌داری نشان داد که احتمالاً علت این امر مربوط به تقویت سیستم آنتی اکسیدانی توسط پروپیوتیک‌ها می‌باشد که نتیجه آن کاهش سطح قندخون است (۲۵). نتایج این مطالعه نیز با آن‌ها همخوانی دارد.

بررسی انجام شده در سال ۲۰۱۵ نشان داده شد که ترکیبات و عوامل آنتی اکسیدانی سبب کاهش انسولین

هیستون با پروتامین اسپرم‌ها در موش‌های دیابتی می‌گردد. بنابراین با توجه به افزایش شیوع بیماری دیابت و هزینه‌های درمان دیابت و عوارض آن بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش احتمالاً مصرف منظم و طولانی مدت پروپویوتیک‌های لاکتوپاسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس، می‌تواند در موش‌های صحرایی دیابتی بر میزان سطح گلوكز خون و درصد جایگزینی هیستون با پروتامین تأثیر داشته باشد.

سپاس و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه دانشجوی ارشد رشته بیوتکنولوژی میکروبی در گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد تهران مرکزی انجام شد و نویسنده‌گان مقاله حاضر بدینوسیله از شرکت پروپویوتیک تک ژن سپاسگزاری صمیمانه خود را ابراز می‌دارند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسنده‌گان بیان نشده است.

References:

- 1.Kautzky-Willer A, Harreiter J, Winhofer-Stöckl Y, et al. Gestational Diabetes Mellitus (Update 2019). Wien Klin Wochenschr 2019; 131(1): 91-102.
- 2.Wandell PE. Quality of Life of Patients with Diabetes Mellitus, An Overview of Research in Primary Health Care in the Nordic Countries. Scand J Prim Health Care 2005; 23(2): 68-74.
- 3.Tangvarasittichai S.Oxidative Stress, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Type 2 Diabetes Mellitus. World J Diabetes 2015; 6(3): 456-80.
- 4.Al-Numair KS, Chandramohan G, Veeramani C, et al. Ameliorative Effect of Kaempferol, a Flavonoid, on Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Redox Rep 2015; 20(5): 198-209.
- 5.Aboonabi A, Rahmat A, Othman F. Antioxidant Effect of Pomegranate Against Streptozotocin-Nicotinamide Generated Oxidative Stress Induced Diabetic Rats. Toxicol Rep 2014; 1: 915-22
- 6.Kianifard D, Sadrikhanlou RJ, Hasanzadeh SH. The Ultrastructural Changes of the Sertoli and Leydig

اسپرم‌یوزنر، بیوسنتر چربی‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است. همچنین، در این مرحله متراکم شدن کروماتین و جایگزینی پروتامین به جای هیستون (که در طی بلوغ اسپرم اتفاق می‌افتد) در اسپرم رخ می‌دهد و عوامل اکسیداتیو می‌تواند برآن اثرگذار باشد (۲۹). مطالعات نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو یکی از مکانیسم احتمالی استرپتوزوتوسین در ایجاد شرایط آسیب می‌باشد (۱۰) لذا می‌توان گفت که افزایش درصد اسپرم‌های نابالغ در مطالعه حاضر احتمالاً به دلیل استرس اکسیداتیو ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین و القا دیابت می‌باشد.

با توجه به نتایج به دست آمده، پروپویوتیک‌های مورد استفاده در این پژوهش لاکتوپاسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس نیز احتمالاً با مسیرهای یاد شده با کاهش سطح گلوكز خون در موش‌های دیابتی باعث کاهش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژنی و کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از آن می‌شوند و از این طریق نیز می‌توان بر بلوغ اسپرم‌ها تأثیر بگذارند.

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعه حاضر می‌توان گفت که مصرف پروپویوتیک باعث بهبود وضعیت درصد جایگزینی

- Cells Following Streptozotocin Induced Diabetes. *Iran J Basic Med Sci* 2012; 15(1): 623-35.
- 7.Ahn C, An BS, Jeung EB. Streptozotocin Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis Via Disruption of Calcium Homeostasis in Mouse Pancreas. *Mol Cell Endocrinol* 2015; 412: 302-8.
- 8.Omolaoye S, Temidayo S, Du Plessis S. Diabetes Mellitus and Male Infertility. *Asian Pac J Reprod* 2018; 7(1): 6-14.
- 9.Abbasi Z, Fatemi Tabatabaei SR, Mazaheri Y, et al. Effects of Sesame Oil on the Reproductive Parameters of Diabetes Mellitus-Induced Male Rats. *World J Mens Health* 2013; 31(2): 141-9.
- 10.Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol Res* 2001; 50(6): 536-46.
- 11.Morimoto S, Mendoza-Rodriguez CA, Hiriart M, et al. Protective Effect of Testosterone on Early Apoptotic Damage Induced by Streptozotocin in Rat Pancreas. *J Endocrinol* 2005; 187(2): 217-24.
- 12.Korejo NA, Wei QW, Shah AH, et al. Effects of Concomitant Diabetes Mellitus and Hyperthyroidism on Testicular and Epididymal Histoarchitecture and Steroidogenesis in Male Animals. *J Zhejiang Univ Sci B* 2016; 17(11): 850-63.
- 13.Baccetti B, La Marca A, Piomboni P, et al. Insulin-Dependent Diabetes in Men is Associated with Hypothalamo-Pituitary Derangement and with Impairment in Semen Quality. *Hum Reprod* 2002; 17(10): 2673-7.
- 14.Halliwell B. Free Radicals and Antioxidants: Updating A Personal View. *Nutr Rev* 2012; 70(5): 257-65.
- 15.Dos Santos JM, Tewari S, Mendes RH. The Role of Oxidative Stress in the Development of Diabetes Mellitus and Its Complications. *J Diabetes Res* 2019; 1-3.
- 16.Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes Mellitus and Oxidative Stress—A Concise Review. *Saudi Pharm J* 2016; 24(5): 547-53.
- 17.Zhan CN, Li FX, Xu WN, et al. Combined Effects of Dietary Fructooligosaccharide and *Bacillus Licheniformis* on Innate Immunity Antioxidant Capability and Disease Resistance of *Triangular Bream(Megalobrama Terminalis)*. *Fish Shellfish Immunol* 2013; 35(5): 1380-6.
- 18.Imani Fooladi AA, Yazdi MH, Pourmand MR, et al. Th1 Cytokine Production Induced by *Lactobacillus acidophilus* in BALB/c Mice Bearing Transplanted Breast Tumor. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8(4): e17354.
- 19.De Andrade Calaça PR, Bezerra RP, Albuquerque WWC, et al. Probiotics as a Preventive Strategy for Surgical Infection in Colorectal Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials. *Transl Gastroenterol Hepatol* 2017; 2(8): 67.
- 20.Mohammadi J, Mirzaei A, Azizi A, et al. The effects of hydroalcoholic extract of *Juglans regia* leaf on histological changes of Langerhans islet in diabetic rats model. *Iran South Med J* 2012; 15(4): 293-302
- 21.Mazloom Z, Yousefinejad A, Dabbaghmanesh MH. Effect of Probiotics on Lipid Profile, Glycemic Control, Insulin Action, Oxidative Stress, and Inflammatory Markers in Patients with Type 2 Diabetes: a Clinical Trial. *Iran J Med Sci* 2013; 38(1): 38-43.
- 22.Shikhbahaei F, Ghanbari A, Keshtmand Z. Therapeutic Effect of Thymoquinone Against Methotrexate-Induced Damage on Sperm Parameters in Mice. *Int J Morphol* 2018; 36(2): 519-22.
- 23.Wong A, Chuan SS, Patton WC, et al. Addition of Eosin to the Aniline Blue Assay to Enhance Detection of Immature Sperm Histones. *Fertil Steril* 2008; 90(5): 1999-2002.
- 24.Yadav H, Jain S, Sinha PR. Antidiabetic Effect of Probiotic Dahi Containing *Lactobacillus Acidophilus* and *Lactobacillus Casei* in High Fructose Fed Rats. *Nutrition* 2007; 23(1): 62-8.
- 25.Yadav H, Jain S, Sinha PR. Oral Administration of Dahi Containing Probiotic *Lactobacillus Acidophilus* and *Lactobacillus Casei* Delayed the Progression of Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *J Dairy Res* 2008; 75(2): 189-95.

- 26.Badkoyeh H, Jafari P, Akbarei N. The Effect of *Lactobacillus Casei* Native Iranian TD2 Strain on Blood Glucose in Male Wistar Diabetic Rats. *J Anim Physiol Dev* 2013; 6(3): 17-22.(Persian)
- 27.Kumawat M, Sharma TK, Singh I, et al. Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with and without Nephropathy. *N Am J Med Sci* 2013; 5(3): 213-9.
- 28.Shaikh H, Shrivastava VK, Amir M. Diabetes Mellitus and Impairment of Male Reproductive Function: Role of Hypothalamus Pituitary Testicular Axis and Reactive Oxygen Species. *Iran J Diabetes Obes* 2016; 8(1): 41-50.
- 29.Komljenovic D, Sandhoff R, Tiebler A, et al. Disruption of Blood-Testis Barrier Dynamics in Ether-Lipid-Deficient Mice. *Cell Tissue Res* 2009; 337(2): 281-99.

Original Article

The Effect of Probiotic *Bifidobacterium Lactis* and *Lactobacillus Casei* on Sperm Maturation in Streptozotocin-Diabetic Rats

S. Abasi (MSc)^{I*}, Z. Keshtmand (PhD)^{I**}

^I Department of Biolog, School of Science, Central Tehran Branch Islamic Azad University, Tehran, Iran

(Received 1 Jul, 2019)

Accepted 22 Oct, 2019)

Abstract

Background: Diabetes is one of the most prevalent diseases in the world with its side effects, for instance in reproductive system. Probiotics are beneficial microorganisms that have preventive and therapeutic effects. The present study aimed to evaluate the effect of probiotics *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus casei* on sperm maturation in streptozotocin-induced diabetic rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 35 male Wistar rats were divided into five groups: control, diabetic (type 1), diabetic rats treated with *B.lactis* and *L.casei* and a mixture of both probiotics. Diabetic groups were injected intraperitoneally with streptozotocin (60mg/kg). Probiotics were administered for 35 days. At the end of treatment, blood glucose levels, epididymal weight and sperm maturation were evaluated. The percentage of histone-protamine replacement was evaluated by aniline blue staining.

Results: In the present study, blood glucose level in the diabetic group was significantly increased compared to the control group ($P<0.001$), however, the diabetic groups treated with *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* showed a significant decrease compared to the diabetic group ($P<0.001$).

The percentage of immature sperms was significantly increased in diabetic rats compared to the control group ($P<0.001$), and there was a significant increase in probiotic treatment groups compared with diabetic group ($P<0.05$).

Conclusion: Probiotics *B. lactis* and *L. casei* have a positive effect on lowering blood glucose and improving sperm maturation in diabetic rats.

Keywords: Streptozotocin, Diabetic, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium lactis*, Rat

©Iran South Med J All right reserved

Cite this article as: Abasi S Keshtmand, Z. The Effect of Probiotic *Bifidobacterium Lactis* and *Lactobacillus Casei* on Sperm Maturation in Streptozotocin-Diabetic Rats. Iran South Med J 2020; 22(6):392-401

Copyright © 2020 Abasi, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

*Address for correspondence: Department of Biology, Central Tehran Branch Islamic Azad University, Tehran, Iran.
Email: zkeshtmand2001@gmail.com

*ORCID: 0000-0001-8312-3193

**ORCID: 0000-0002-9759-1446