مجله دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه
دوره ۱۱. شماره ۲. تابستان ۱۴۰۲

مقاله پژوهشی

بررسی مقایسه ای اثرات دیابت و کم کاری تیروئیدی بر کیفیت کروماتین اسپرم در موش های بالغ

الناز خرداد[۱،۲]، محمد رضا نیکروش[۲]، مهدی جلالی[۲]، فاطمه علیپور[۲*]، فریماه بهشتی[۳]

۱. گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران
۲. گروه علوم تشریح وبیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، ایران

چکیده

زمینه و هدف: بیماری دیابت و عملکرد غیر طبیعی تیروئید باعث اختلال در سیستم تولید مثلی می شوند که با عوارضی مانند کاهش میزان تستوسترون، قطر لوله سمی نفروس، میل جنسی، تحرک اسپرم، موفولوژی اسپرم های طبیعی و باروری همراه است. مشخص شده است که سطح بالای قند خون و کاهش هورمون های تیروئیدی ممکن است بر کیفیت اسپرم تاثیر بگذارد و شانس باروری مردان را کاهش دهد. همچنین نشان داده شده است که تغییر در ساختار کروماتین اسپرم در طی فرآیند اسپرماتوژنز، با کاهش تعداد و تحرک و یا مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم همراه است. بنابراین این مطالعه با هدف بررسی اثرات دیابت و کم کاری تیروئیدی بر کیفیت کروماتین اسپرم طراحی گردید.

روش‌ها: در این مطالعه ۶۰ سر موش نر نژاد Balb/C به صورت تصادفی به ۵گروه: ۱) کنترل، ۲) دیابتی، ۳) دیابت +انسولین، ۴) شم و ۵) گروه کم کاری تیروئیدی تقسیم شدند. بعد از ۳۵ روز، اپیدیدیم های چپ برای بررسی کیفیت کروماتین اسپرم با رنگ آمیزی آنیلین بلو خارج گردیدند.

نتایج: نتایج این تحقیق نشان داد که، یکپارچگی کروماتین اسپرم بصورت افزایش درصد کروماتین های غیرطبیعی و کاهش کیفیت کروماتین در گروه های دیابتی و کم کاری تیروئیدی به طور معناداری در مقایسه با سایر گروه ها تغییر کرد ($P<0.05$) و درمان با انسولین این پارامتر را در مقایسه با گروه دیابت بهبود بخشید($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: یافته های ما نشان داد که دیابت و کم کاری تیروئیدی تاثیرات منفی بر یکپارچگی کروماتین اسپرم دارند و ابتلاء به این بیماری‌های زمینه ای احتمالا سبب افزایش ناباوری خواهد شد.

کلید واژه‌ها:
دیابت،کم‌کاری‌تیروئیدی، کروماتین اسپرم، موش

تمامی‌حقوق‌نشربرای‌دانشگاه علوم‌پزشکی‌تربت‌حیدریه محفوظ است.

***آدرس نویسنده مسئول: مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده پزشکی**

مقدمه

ناباروری یکی از مهم ترین مسائل اجتماعی در میان جوامع می‌باشد، و به طور کلی تقریبا در نیمی از مشکلات مربوط به ناباروری زوجین، فاکتورهای مردانه دخالت دارند. ریسک فاکتورهای مختلفی در بروز ناباروری در مردان دخیل هستند (۱, ۲) که از جمله آن ها می توان به برخی بیماری های زمینه‌ای همچون دیابت و کم کاری تیروئیدی اشاره کرد.

دیابت شیرین یکی از شایع ترین بیماری های متابولیکی است که با افزایش قند خون همراه است. دیابت نوع I با نقص در تولید انسولین و دیابت نوع II با مقاومت بافت های محیطی به انسولین به همراه کاهش ترشح انسولین از سلول های بتای جزایر لانگرهانس لوزالمعده مشخص می شود (۳, ٤). دیابت تاثیرات ساختاری و عملکردی متفاوتی بر بافت های مختلف بدن داشته و در دراز مدت با عوارض چشمی، کلیوی، قلبی ـعروقی و عصبی همراه می باشد (٥). همچنین مطالعات نشان داده اند که دیابت باعث ایجاد عوارضی مانند کاهش میزان تستوسترون، کاهش قطر لوله های سمی نفروس بیضه، کاهش میل جنسی، افزایش اسپرم های ناهنجار و ناباروری می شود (٦, ٧)

همچنین مطالعات مختلفی نشان داده اند که هورمون های تیروئیدی نقش مهمی در تکوین و عملکرد بیضه دارند و اختلال در فعالیت غده ی تیروئید نه تنها با اختلال در عملکرد و ناهنجاری‌های مورفولوژیکی بیضه مرتبط است، بلکه با تغییر فعالیت‌های جنسی و کاهش باروری در مردان نیز همراه می‌باشد. مطالعاتی نشان داده اند که هورمون های تیروئیدی بخصوص در زمان تکوین بیضه ها نیز نقش مهمی بازی می‌کنند. اکنون محرز شده است که هورمون تری یدوتیرونین (T3) بلوغ و رشد بیضه را تنظیم کرده و تکثیر و تمایز سلول های سرتولی را در طی تکوین بیضه کنترل می کند. به علاوه، این هورمون در تمایز سلول های لیدیگ و تحریک آن ها برای ساخت استروئیدها در بیضه نیز نقش دارد (۱۰-۸). و مشخص شده است که کم کاری تیروئیدی دارای اثرات سوء بر روی برخی پارامترهای اسپرم مانند: تعداد اسپرم های زنده، مورفولوژی اسپرم و حرکت اسپرم می باشد (۱۱, ۱۲). دیابت و کم کاری تیروئیدی با تاثیر بر روی پارامترهای اسپرم بر روی باروری تاثیر می گذارند، از طرفی بین یکپارچگی کروماتین هسته ی اسپرم و باروری نیز ارتباط وجود دارد. افزایش سطح آسیب DNA اسپرم اغلب با کاهش تعداد و تحرک یا مورفولوژی غیرطبیعی آن همراه است (۱۳- ۱٥). تراکم ساختار کروماتین اسپرم در طی فرآیند اسپرماتوژنز، عمدتا با جایگزینی هیستون ها با پروتامین ها تغییر می کند. هر گونه نقص در بیان نوکلئوپروتئین اسپرم منجر به ساختار هسته ای غیر طبیعی اسپرم می شود و ممکن است بر باروری مردان تأثیر بگذارد. شواهد موجود نشان می دهد در مواردی که آسیب DNA اسپرم بیشتر از ۳۰٪ باشد، احتمال باروری طبیعی به شدت کاهش می یابد. همچنین افزایش قابل توجه آسیب DNA اسپرم در مردان نابارور نسبت به مردان بارور نشان داده شده است. از طرف دیگر افزایش میزان سقط جنین را در سیکل IVF انجام شده در مردان با درصد بالای آسیب DNA اسپرم گزارش کرده اند. بنابراین ارزیابی صحت یکپارچگی کروماتین اسپرم می‌تواند اطلاعات بهتری را د ر مورد ناباروری با عامل مردانه فراهم سازد (۱٦-۱۸). هیپرگلیسمی با تولید استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پیشرفت بیماری های دیابتی دارد. همچنین از آنجایی که هورمون های تیروئیدی کنترل متابولیسم بدن را بر عهده دارند، در نتیجه این هورمون ها تنظیم کننده اصلی مصرف اکسیژن در سلول های مختلف بدن هستند و روی حالت پایدار ROS ها درون محیط سلول اثر می گذارند. در مطالعات مختلفی گزارش شده است که تغییر در سطح هورمون های تیروئیدی باعث تغییر در وضعیت ROS می گردد. شواهد زیادی نیز وجود دارد که نشان می دهد، کم کاری تیروئیدی با استرس اکسیداتیو و آسیب سلولی در ارتباط است (۱۹, ۲۰). استرس اکسیداتیو یکی از عوامل اصلی ناباروری مردان است که عملکرد سلول مانند حرکت اسپرم و آسیب DNA را تحت تاثیر قرار می دهد (۱٥, ۲۱, ۲۲). با توجه به شیوع بیماری های دیابت و کم کاری تیروئیدی و تاثیر این بیماری ها بر باروری مردان، در این مطالعه

اثر این دو بیماری بر یکپارچگی کروماتین اسپرم که فاکتور مهمی در باروری می باشد مورد بررسی قرار گرفته است.

روش‌ها

برای انجام این مطالعه ی تجربی، تعداد ٦٠ سر موش نر نژاد با وزن تقریبی ۲۵-۲۰ گرم، از خانه ی حیوانات دانشکده پزشکی مشهد تهیه و در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی ، در دمای ۲۱ °C و رطوبت نسبی ۵۰٪) نگهداری شدند. حیوانات در طول دوره مطالعه دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. سپس بعد از سازگاری با شرایط خانه حیوانات، موش‌ها بطور تصادفی به ٥ گروه به منظور بررسی اثر دیابت به شرح ذیل تقسیم شدند (n=۱۲):

۱) گروه کنترل که مداخله ای روی آن صورت نگرفت.

۲) گروه دیابتی که دیابت از طریق تزریق داخل صفاقی یک نوبت استرپتوزوتوسین[1] (STZ) در روز ایجاد شد.

۳) گروهی که STZ به همراه انسولین دریافت کردند (۲۳).

٤) گروه شم که بافر سیترات[2] (pH: 4.5) دریافت کردند.

٥) گروه کم کاری تیروئیدی: موش های این گروه داروی پروپیل تیواوراسیل[3] (PTU) (Iran hormone. Iran) را به صورت محلول درآب آشامیدنی با دوز mg/l ۵۰۰، به مدت ۳۵ روزدریافت کردند (۲٤, ۲٥).

دیابت از طریق تزریق داخل صفاقی STZ محلول در(۵۰۰µl) بافر سیترات (pH= 4.5)، با دوز ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش (به صورت پنج روز متناوب) ، ایجاد شد (۲٦). سه روز (۷۲ ساعت) بعد از تزریق برای اطمینان از دیابتی شدن، خونگیری از ورید دمی موش ها انجام شد. حیواناتی که میزان قند خون آن ها بیشتر از ۲۵۰ میلی گرم بر دسی لیتر بود به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند. میزان قند خون حیوانات در مدت آزمایش با دستگاه گلوکومتر (Easy Gluco, Infopia, Korea) اندازه گیری شد. در گروه STZ به همراه انسولین، حیوانات۲-۱/٥ واحد انسولین [Lansulin (NPH) 70/30] به صورت زیر جلدی دریافت کردند.

بعد از پایان دوره تیمار، حیوانات با استفاده از اتر بیهوش شده و سپس از قلب موش ها خون گیری به عمل آمد. به منظور جداسازی سرم، نمونه خون های جمع آوری شده پس از لخته شدن به سانتریفوژ منتقل شده و با ۳۰۰۰-۲۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سرم های جدا شده بلافاصله به میکروتیوب ها منتقل گردیدند و تا زمان انتقال به آزمایشگاه، جهت اندازه گیری سطح هورمون T4، در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. میزان T4در این پژوهش با استفاده از روش الکتروکمی لومینسانس و در آزمایشگاه تشخیص طبی نوید انجام شد.

بعد از گذشت ۳۵ روز از شروع مطالعه موش ها با استفاده از اتر کشته و بعد از باز کردن حفره شکمی، اپیدیدم آن ها خارج شد. دم اپیدیدیم ها بعد از قطعه قطعه شدن توسط قیچی استریل، در داخل لوله های فالکون، که حاوی ۱ سی سی سرم فیزیولوژیک بودند، قرار داده شد و سپس به انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتیگراد) منتقل شدند و پس از گذشت حدود نیم ساعت و خروج اسپرم ها از اپیدیدیم، ٥٠ لاندا از آن روی لام قرار داده شد و با استفاده از یک لام دیگر به روی لام دیگر با زاویه ٤٥ درجه پخش گردید. اسمیر بدست آمده درهوای آزمایشگاه قرار گرفت تا کمی خشک شود و سپس با استفاده از محلول متانول ۷۰ ٪ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق فیکس شدند (۲۷). برای بررسی یکپارچگی کروماتین اسپرم، از روش رنگ آمیزی آنیلین بلو استفاده شد. رنگ آمیزی آنیلین بلو برای ارزیابی حضور بیش از حد هیستون‌ها استفاده شد (۲۸-۳۰).

رنگ آمیزی آنیلین بلو (AB)

برای انجام این رنگ آمیزی، نمونه ها در آب مقطر به مدت ۲ دقیقه شسته شدند و سپس با محلول **آنیلین بلو** ۵٪ (Germany Merck,) در اسید استیک (۳/٥pH)، به مدت ٥ دقیقه رنگ آمیزی

1.Streptozotocin

2. Citrate Buffer

3. Propylthiouracil

شدند و سپس نمونه ها با آب مقطر شسته شدند و با الکل ۹۶ و ۱۰۰ درجه به ترتیب آبگیری شدند، سپس توسط زایلن شفاف شده و در نهایت چسبیده و لام آماده شد. اسلایدها توسط میکروسکوپ نوری (Olympus BX51, Japan) با بزرگنمایی ۱۰۰۰ × تصویر برداری و در هر گروه ۱۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم های دارای سر آبی کم رنگ (AB^-) با پروتامین غنی از سیستئین و آرژنین به عنوان سلول سالم و اسپرم های دارای سر آبی پررنگ (AB^+) با پروتئین های هیستون اضافی غنی از لیزین به عنوان سلول آسیب دیده اندازه گیری شد (۲۹).

روش بررسی آماری

در پایان اطلاعات بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS 16.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. داده های حاصل از این مطالعه با استفاده از آزمون ANOVA و Tukey Test برای گروه های دیابتی و گروه های کم کاری تیروئیدی با استفاده از آزمون آزمون T- testمورد تجزیه و تحلیل قرارگرفتند. در صورت وجود P< ۰/۰۵ ، تفاوت معنی دار تلقی گردید.

نتایج

تاثیر دیابت بر کیفیت کروماتین اسپرم

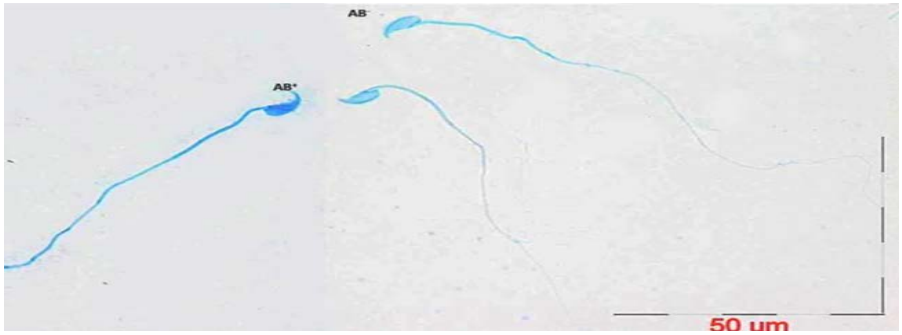
همانطور که در تصویر۱b نشان داده شده است، میزان اسپرم‌های نابالغ با کروماتین غیر طبیعی (AB^+) در گروه دیابتی به طور معناداری بیشتر از گروه های کنترل و شم بود ($P<0.05$). همچنین در صد کروماتین غیر طبیعی در گروه دیابت به همراه انسولین نسبت به گروه دیابتی به طور معناداری کاهش یافت ($P<0.05$). اختلاف قابل توجهی در گروه های دیابت به همراه انسولین، شم و کنترل وجود نداشت (تصویر۱a).

تاثیر کم کاری تیروئیدی بر کیفیت کروماتین اسپرم

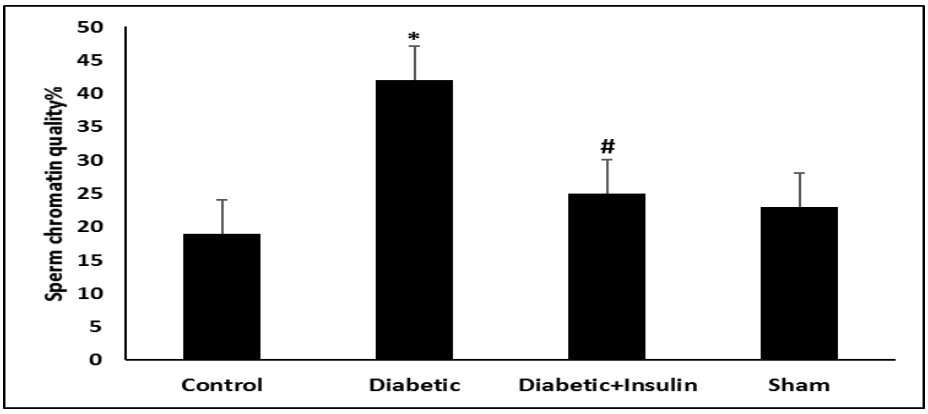
تصویر۲a نشان دهنده تغییرات در ساختار کروماتین اسپرم ها در گروه های مختلف پس از رنگ آمیزی آنیلین بلو (AB) می‌باشد. آنالیز آماری داده های حاصل از این رنگ آمیزی نشان داد که افزایش معناداری در میانگین درصد کروماتین های نابالغ (AB^+) در ا سپرم های گروه کم کاری تیروئیدی ذ سبت به گروه کنترل وجود دارد که در این اسپرم ها به دلیل وجود هیستون اضافی، هسته اسپرم ها به صورت آبی تیره قابل مشاهده بودند ($P<0.05$). اما در گروه کنترل درصد بیشتر ی از اسپرم ها دارای سرهای آبی روشن (AB^-) بودند که نشان دهنده بلوغ بیشتر کروماتین اسپرم ها در این گروه می باشد (تصویر۲b).

مقایسه تاثیر دیابت و کم کاری تیروئید بر یکپارچگی کروماتین اسپرم

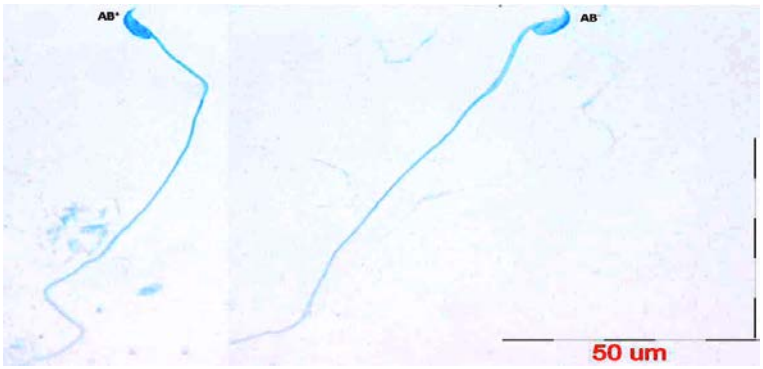
براساس نمودارهای ۱ و ۲ مقایسه اثرات دیابت و کم کاری تیروئید نشان می دهد درصد کروماتین غیر طبیعی در این دو گروه اختلاف معناداری نشان نمی دهد اما هر دو گروه در مقایسه با گروه کنترل در میزان ا سپرم های نابالغ با کروماتین غیر طبیعی اختلاف معنادار نشان دادند ($P<0.05$).



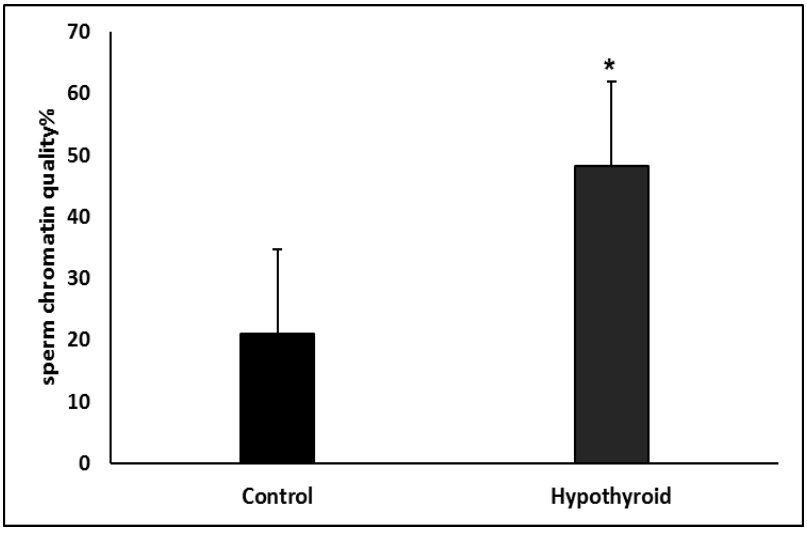
تصویر۱: تصویر میکروسکوپ نوری از اسمیر اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی آنیلین بلو(AB). در این رنگ آمیزی درصد اسپرم های AB^+ در گروه کنترل نسبت به گروه دیابت کمتر بود. گروه دیابت دارای درصد بالایی از کروماتین های نابالغ بود که با سرهای آبی تیره(AB^+) ظاهر شدند که نشان دهنده وجود هیستون های اضافی در کروماتین است و اسپرم هایی که کروماتین طبیعی داشتند با سرهای آبی روشن(AB^-) ظاهر شدند.



تصویرb۱: نتایج ارزیابی کیفیت کروماتین در گروه های مختلف. داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده اند. سطح معناداری در نظر گرفته شد. $P<0.05$* اختلاف معنادار با گروه کنترل.$P<0.05$ # اختلاف معنادار با گروه دیابتی.



تصویرa۲: تصویر میکروسکوپ نوری از اسمیر اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی آنیلین بلو(AB). در این رنگ آمیزی درصد اسپرم های AB^+ در گروه کنترل نسبت به گروه کم کاری تیروئید کمتر بود. گروه کم کاری تیروئید دارای درصد بالایی از کروماتین های نابالغ بود که با سرهای آبی تیره(AB^+) ظاهر شدند که نشان دهنده وجود هیستون های اضافی در کروماتین است و اسپرم هایی که کروماتین طبیعی داشتند با سرهای آبی روشن(AB^-) ظاهر شدند.



تصویرb۲: نتایج ارزیابی کیفیت کروماتین در گروه های مختلف. داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده اند. سطح معناداری در نظر گرفته شد. $P<0.05$* اختلاف معنادار با گروه کنترل.

بحث

اخیرا، یکی از رویکردهای جدید برای ارزیابی علل ناباروری در مردان، بررسی عملکرد اسپرم و خصوصا ارزیابی کروماتین هسته اسپرم می باشد. از آن جایی که نیمی از ژنوم جنینی از گامت‌های مرد می باشد، هرگونه ناهنجاری در ساختار کروماتین اسپرم می تواند بر جنین تاثیر نامطلوب بگذارد. تراکم کروماتین در اسپرم یک نوع بسته بندی خاص در کروماتین است که در طی مرحله اسپرمیوژنز اتفاق می افتد که در آن پروتامین به جای هیستون در کروماتین هسته قرار می گیرد. این جایگزینی در تراکم و پایداری اسپرم بسیار مهم بوده و نقش کلیدی در باروری دارد (۲۱, ۳۱). مطالعات مختلف نشان داده اند که نسبت هیستون/ پروتامین در مردان نابارور نسبت به افراد بارور بیشتر است و وجود این نقص موجب اختلال در تراکم کروماتین اسپرم شده که همین امر، مستعد شدن DNA اسپرم برای آسیب، در مقابل شوک های خارجی را به دنبال دارد. این نتایج بیانگر یک ارتباط مستقیم بین کمبود پروتامین و آسیب DNA و در نتیجه کاهش میزان لقاح در بیماران می باشد (۳۲-۳٤).

در پژوهش حاضر نیز، برای بررسی تغییرات احتمالی در کروماتین اسپرم بدنبال کم کاری تیروئیدی و دیابت از روش سیتوشیمی آنیلین بلو استفاده گردید. تجزیه و تحلیل نتایج نشان داد که بیماری دیابت و کم کاری تیروئیدی می توانند موجب افزایش درصد کروماتین های غیر طبیعی در اسپرم ها گردند. مطالعات متعددی در جهت بررسی آسیب به DNA انجام شده است که می توان به مطالعه ی Agbaje و همکارانش در سال ۲۰۰۷ اشاره کرد که، نشان دادند، دیابت با افزایش آسیب هسته‌ای اسپرم ارتباط دارد و در افراد دیابتی میزان این آسیب افزایش می یابد که ممکن است توانایی تولید مثل این مردان را مختل کند (۳۵). همچنین مطالعه ی Pourentezari و همکاران در سال ۲۰۱٦ در ارتباط با، بررسی اثرات الکل بر پارامتر های اسپرم در موش‌های دیابتی نشان داد که سلول های AB^+ در گروه دیابتی به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است (۳٦). همسو با مطالعه ی Pourentezari، در مطالعه ی حاضر نیز، در رنگ آمیزی AB، که نشان دهنده سلول های اسپرم با هیستون‌های بیش از حد است، اختلاف معنی داری بین گروه کنترل و دیابتی مشاهده شد. همچنین بین گروه دیابتی و گروه دریافت کننده ی انسولین اختلاف معنی داری وجود داشت. در مطالعه ای که Mangoli و همکاران بر روی اثرات دیابت بر پارامترهای اسپرم و کیفیت کروماتین آن در سال ۲۰۱۳ انجام دادند، تفاوت معنی داری بین گروه کنترل و دیابتی مشاهده نکردند (۲۱). که نتایج مطالعه ی حاضر با مطالعه ی Mangoli مطابق نبود. در این مطالعه همچنین نشان داده شد که در گروه کم کاری تیروئیدی درصد اسپرم های با کروماتین غیر طبیعی افزایش یافته است که ممکن است با کاهش پروتامیناسیون هسته اسپرم ها در این گروه همراه باشد. از طرف دیگر اختلال در عملکرد سلول های سرتولی در اثر کم کاری تیروئیدی (۲۰, ۳۷) نیز ممکن است موجب اختلال در سنتز پروتئین های انتقالی شده که به عنوان عامل بسیار مهمی در تسهیل جایگزینی پروتامین در مرحله بلوغ نهایی اسپرم شناخته می شوند. از طرف دیگر کاهش سنتز پروتامین توسط سلول های سرتولی نیز می تواند باعث کاهش چشم گیر در میزان پروتامیناسیون اسپرم ها و در نهایت افزایش تعداد اسپرم های با کروماتین غیر طبیعی شود (۳۲, ۳۷). با توجه به مطالعات گذشته، هر دو بیماری دیابت و کم کاری تیروئید توانسته اند موجب اختلال در فرایند تراکم کروماتین اسپرم در زمان اسپرماتوژنز گردند (۳۸-٤۱).

در ارتباط با علت های آسیب به بیضه در بیماران دیابتی موارد مختلفی بیان شده است، از جمله آشفتگی های روانی و یا نارسایی های ارگانیک، ارتباط اثرات سوء دیابت با محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - بیضه و همچنین ارتباط استرس اکسیداتیو با اختلالات دستگاه تناسلی نر در افراد دیابتی سطح استرس اکسیداتیو در حالت هیپرگلیسمی به علت تشکیل بیش از حد ROS ها بالا است (٤, ٤۲). مطالعات قبلی نشان دادند که در بیماران دیابتی به دلیل تولید بیش از حد ROS و کاهش کارایی آنزیم های آنتی اکسیدان سطح استرس اکسیداتیو بالا بوده، همچنین با بررسی پارامتر های اسپرم نشان دادند که احتمالا

استرس اکسیداتیو عامل مهمی در اختلال باروری مردان است (۳۶). در طی فرآیند بلوغ، اسپرم ها بخش زیادی از سیتوپلاسم خود را از دست می دهند. فقدان بخش عمده سیتوپلاسمی باعث کاهش سیستم دفاع آنتی اکسیدانی می شود. Aziz و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که میان استرس اکسیداتیو و نسبت اسپرم های غیر نرمال ارتباط معناداری وجود دارد (۴۳)، همچنین نشان داده شده است که دیابت نیز تاثیر منفی بر کیفیت کروماتین اسپرم می گذارد (۱۵).

همچنین هورمون های تیروئیدی تنظیم کننده اصلی مصرف اکسیژن در سلول های مختلف بدن پستانداران هستند و روی حالت پایدار رادیکال های آزاد درون محیط سلول اثر می گذارند و نظر رایجی که در این مورد وجود دارد این است که کم کاری تیروئیدی باعث افزایش رادیکال های آزاد شده و درنتیجه آسیب درون سلولی را تسهیل می کند. گزارش شده است که وجود مقادیر بیش از حد رادیکال های آزاد می تواند باعث آسیب جدی به ساختار و عملکرد اسپرم گردد (۹, ۴۴, ۴۵). استرس اکسیداتیو با تغییر عملکرد سلولی مانند حرکت اسپرم، افزایش آسیب DNA توسط القای جهش های ژنی، واسرشت DNA و قطعه قطعه شدن DNAعامل اصلی ناباروری مردان است (۴۶, ۴۷). بطوریکه برخی از مطالعات گذشته نشان داده اند که تجویز آنتی اکسیدان ها می تواند با کاهش سطح فاکتور های محیطی مانند رادیکال های آزاد ، عملکرد توان یابی و قدرت بارور سازی اسپرم را بهبود ببخشد (۴۸, ۴۹). Sabour و همکاران مکانیسم احتمالی تاثیرات مخرب مت آمفتامین بر روی تمامیت DNA اسپرم را افزایش ROS بدنبال مصرف مت آمفتامین ذکر کردند (۵۰). Pourentezariو همکاران نیز تاثیرات منفی آکریلامید بر روی کروماتین اسپرم را ناشی از تولید بیش از حد ROS و کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی سلول های جنسی دانستند (۵۱). همچنین در گزارش Heidari و همکاران نیز، تولید بیش از حد ROS در بیماری واریکوسل موجب افزایش در آسیب DNA اسپرم گردید (۲۸). در مطالعه حاضر نیز بیماری دیابت و کم کاری تیروئیدی بر روی کیفیت کروماتین اسپرم تاثیر منفی گذاشته اند به طوری که در گروه های دیابتی و کم کاری تیروئیدی شاهد تغییرات چشمگیری در میزان درصد اسپرم های غیر طبیعی بودیم که هر دو بیماری احتمالا از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو توانسته اند اثرات مخربی بر روی کیفیت کروماتین داشته باشند (۳۹, ۵۲-۵۴).

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که دیابت و کم کاری تیروئیدی موجب تغییرات منفی بر روی کیفیت کروماتین اسپرم می شوند. هرچند که مقایسه این دو گروه با یکدیگر اختلاف معناداری نشان نمی دهد اما در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معناداری مشاهد شد که احتمالا نشان دهنده افزایش ناباروری در اثر ابتلاء به این بیماریهای زمینه ای خواهد بود. با توجه به نتایج بدست آمده می توان احتمال داد که دیابت و کم کاری تیروئیدی ممکن است با سوق دادن شرایط فیزیولوژیک به سمت استرس اکسیداتیو موجب این تغییرات غیرطبیعی در اسپرم موش ها شده باشد، که در نتیجه آن احتمالا می تواند، باعث کاهش پتانسیل تولید مثلی در موش های مورد مطالعه شود. هرچند باید این نکته را نیز خاطر نشان کرد که مطالعات دقیق تری در این زمینه برای تأیید این یافته ها مورد نیاز می باشد و پیشنهاد می گردد در کنار انسولین، اثرات محافظتی آنتی اکسیدانهای مختلف مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نتایج بخشی از یافته های این مطالعه از طرف معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تصویب و به اجرا در آمده است. در پایان نویسندگان از معاونت محترم و شورای محترم پژوهشی دانشگاه و از همکاری صمیمانه سرکار خانم فاطمه متجدد کارشناس گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی کمال تشکر و سپاسگزاری را دارند.

تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافعی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

مشارکت نویسندگان:

(۱) مفهوم پردازی و طراحی مطالعه، یا جمع آوری داده ها، یا تجزیه و تحلیل و تفسیر داده ها :همه نویسندگان

(۲) تهیه پیش نویس مقاله یا بازبینی آن جهت تدوین محتوای اندیشمندانه: همه نویسندگان

(۳) تایید نهایی دستنوشته پیش از ارسال به مجله: همه نویسندگان

References

1. Amini M, Shirinbayan P, Behnam B, Roghani M, Farhoudian A, Joghataei MT, et al. Correlation between expression of CatSper family and sperm profiles in the adult mouse testis following Iranian Kerack abuse. Andrology. 2014;2(3):386-93.

2. Miyamoto T, Tsujimura A, Miyagawa Y, Koh E, Namiki M, Sengoku K. Male infertility and its causes in human. Advances in urology. 2012;2012:384520.

3. Gispen WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. Trends Neurosci. 2000;23(11):542-9.

4. 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(4):354-60.

5. Sasso FC, De Nicola L, Carbonara O, Nasti R, Minutolo R, Salvatore T, et al. Cardiovascular risk factors and disease management in type 2 diabetic patients with diabetic nephropathy. Diabetes Care. 2006;29(3):498-503.

6. Abdolahnejad A, Gol A, Sh D. Garlic effects on reproductive complications of diabetes mellitus imn male rats. Physio & Pharma. 2009;12:297-07.

7. Salimnejad R, Sazegar G, Saeedi Borujeni MJ, Mousavi SM, Salehi F, Ghorbani F. Protective effect of hydroalcoholic extract of Teucrium polium on diabetes-induced testicular damage and serum testosterone concentration. Int J Reprod Biomed (Yazd). 2017 Apr;15(4):195-202.

8. Gao Y, Lee WM, Cheng CY. Thyroid hormone function in the rat testis. Front Endocrinol (Lausanne). 2014;5:188 .

9. Sahoo DK, Roy A. Compromised Rat Testicular Antioxidant Defence System by Hypothyroidism before Puberty. Int J Endocrinol. 2012;2012:637825. PubMed PMID: 22315592.

10. Wajner SM, Wagner MS, Maia AL. Clinical implications of altered thyroid status in male testicular function. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2009;53(8):976-82.

11. Nikoobakht MR, Aloosh M, Nikoobakht N, Mehrsay AR, Biniaz F, Karjalian MA. The role of hypothyroidism in male infertility and erectile dysfunction. Urol J. 2012;9(1):405-9.

12. Tahmaz L, Gokalp A, Kibar Y, Kocak I, Yalcin O, Ozercan Y. Effect of hypothyroidism on the testes in mature rats and treatment with levothyroxine and zinc. Andrologia. 2000;32(2):85-9.

13. Carreira JT, Trevizan JT, Carvalho IR, Kipper B, Rodrigues LH, Silva C, et al. Does sperm quality and DNA integrity differ in cryopreserved semen samples from young, adult, and aged Nellore bulls? Basic and clinical andrology. 2017;27:12.

14. Khordad E, Hosseini M, Ebrahimzadeh-Bideskan A, Baghcheghi Y, Tehrani MS, Mansouritorghabeh F, et al. Effects of rosiglitazone and vitamin E on testicular tissue and sperm parameters in propylthiouracil-induced hypothyroidism in rats. Comparative Clinical Pathology. 2022;31(3):547-55.

15. Talebi AR, Mangoli E, Nahangi H, Anvari M, Pourentezari M, Halvaei I. Vitamin C attenuates detrimental effects of diabetes mellitus on sperm parameters, chromatin quality and rate of apoptosis in mice. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2014;181:32-6.

16. Bibi R, Jahan S, Kafeel Qureshi S, Razak S, Afsar T, Almajwal A, et al. Analysis of sperm

chromatin packaging and reproductive biomarker to evaluate the consequence of advanced male age. Frontiers in Endocrinology. 2023;14:1092603.

17. Evenson DP, Wixon R. Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay–derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome. Fertility and sterility. 2008;90(4):1229-31.

18. de la Iglesia A, Jodar M, Oliva R, Castillo J. Insights into the sperm chromatin and implications for male infertility from a protein perspective. WIREs mechanisms of disease. 2023;15(2):e1588. Epub 2022/10/02. eng.

19. Choudhury S, Chainy GB, Mishro MM. Experimentally induced hypo- and hyper-thyroidism influence on the antioxidant defence system in adult rat testis. Andrologia. 2003 Jun;35(3):131-40.

20. Zamoner A, Barreto KP, Filho DW, Sell F, Woehl VM, Guma FC, et al. Propylthiouracil-induced congenital hypothyroidism upregulates vimentin phosphorylation and depletes antioxidant defenses in immature rat testis. J Mol Endocrinol. 2008;40(3):125-35.

21. Mangoli E, Talebi AR, Anvari M, Pourentezari M. Effects of experimentally-induced diabetes on sperm parameters and chromatin quality in mice. Iran J Reprod Med. 2013;11(1):53-60.

22. Mohamed. NA, Gawad. HSA. Taurine dietary supplementation attenuates brain, thyroid, testicular disturbances and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetes mellitus in male rats. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. 2017;6:247–52.

23. Casagrande FB, Ferreira SS, de Sousa ESA, Guimarães JPT, Romera LMD, Tessaro FHG, et al. Insulin Modulates Inflammatory Cytokine Release in Acute Stages and Augments Expression of Adhesion Molecules and Leukocytes in Lungs on Chronic Stages of Paracoccidioidomycosis. Frontiers in immunology. 2020;11:583385.

24. Moghadam Dorafshani M, Jalali M, Nikravesh MR, Ebrahimadeh AR. study of the effect of hypothyroidism on the apoptotic index in rat ovarian follicles, using the tunel technique. ASJ. 2013;10(1):25-35.

25. Mourouzis I, Dimopoulos A, Saranteas T, Tsinarakis N, Livadarou E, Spanou D, et al. Ischemic preconditioning fails to confer additional protection against ischemia-reperfusion injury in the hypothyroid rat heart. Physiol Res. 2009;58(1):29-38.

26. Thomas J, Garg ML, Smith DW. Dietary resveratrol supplementation normalizes gene expression in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic C57Bl/6 mice. J Nutr Biochem. 2014;25(3):313-8.

27. Lu WP, Mei XT, Wang Y, Zheng YP, Xue YF, Xu DH. Zn(II)-curcumin protects against oxidative stress, deleterious changes in sperm parameters and histological alterations in a male mouse model of cyclophosphamide-induced reproductive damage. Environ Toxicol Pharmacol. 2015;39(2):515-24.

28. Heidari R, Alizadeh R, Abbasi N, Pasbakhsh P, Hedayatpour A, Farajpour M, et al. Do Pilea Microphylla Improve Sperm DNA Fragmentation and Sperm Parameters in Varicocelized Rats? Acta Med Iran. 2015;53(9):547-54.

29. Nazar M, Talebi AR, Hosseini Sharifabad M, Abbasi A, Khoradmehr A, Danafar AH. Acute and chronic effects of gold nanoparticles on sperm parameters and chromatin structure in

Mice. Int J Reprod Biomed (Yazd). 2016;14(10):637-42.

30. Pandiar D, Baranwal HC, Kumar S, Ganesan V, Sonkar PK, Chattopadhyay K. Use of jaggery and honey as adjunctive cytological fixatives to ethanol for oral smears. J Oral Maxillofac Pathol. 2017;21(2):317.

31. Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, Borini A. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. Reprod Biomed Online. 2007;14(6):746-57.

32. Aleem M, Choudhari J, Padwal V, Balasinor N, Parte P, Gill-Sharma MK. Hyperprolactinemia affects spermiogenesis in adult male rats. J Endocrinol Invest. 2005 Jan;28(1):39-48.

33. Mardani M, Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Shirazi R, Tavalaee M. Differentiation between the effect of protamine deficiency and failed oocyte activation on fertilization post ICSI. J Ir Anatl Sci. 2006;4:95-103.

34. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction. Curr Opin Urol. 2006;16(6):428-34.

35. Agbaje IM, Rogers DA, McVicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C, et al. Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. Human reproduction (Oxford, England). 2007;22(7):1871-7.

36. Pourentezari M, Talebi AR, Mangoli E, Anvari M, Rahimipour M. Additional deleterious effects of alcohol consumption on sperm parameters and DNA integrity in diabetic mice. Andrologia. 2016;48(5):564-9.

37. Yousofvand N, Mohammadizadeh E, Kazemi M, Yavari F, Dezfoolinezhad S. The Effect of Methimazole–Induced Hypothyroidism on Serum Levels of Copper and Zinc in Albino Rats JIUMS. 2011;20(4):1-10.

38. Akbari H, Elyasi L, Khaleghi AA, Mohammadi M. The effect of zinc supplementation on improving sperm parameters in infertile diabetic men. Journal of obstetrics and gynaecology of India. 2023 Aug;73(4):316-21.

39. Cannarella R, Condorelli RA, Calogero AE, Bagnara V, Aversa A, Greco EA, et al. Effects of Selenium Supplementation on Sperm Parameters and DNA-Fragmentation Rate in Patients with Chronic Autoimmune Thyroiditis. Journal of clinical medicine. 2021;10(16).

40. Pourheydar B, Azarm F, Farjah G, Karimipour M, Pourheydar M. Effect of silymarin and metformin on the sperm parameters and histopathological changes of testes in diabetic rats: An experimental study. International journal of reproductive biomedicine. 2021;19(12):1091-104.

41. Zhao S, Tang L, Fu J, Yang Z, Su C, Rao M. Subclinical Hypothyroidism and Sperm DNA Fragmentation: A Cross-sectional Study of 5401 Men Seeking Infertility Care. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2022 Sep 28;107(10):e4027-e36 .

42. Komaki K, Ohno Y, Aoki N. Gonadal hormones and gonadal function in type 2 diabetes model OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty) rats. Endocr J. 2005;52(3):345-51.

43. Aziz N ,Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ, Jr., et al. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. Fertil

Steril. 2004;81(2):349-54.

44. Kumar A, Shekhar S, Dhole B. Thyroid and male reproduction. Indian J Endocrinol Metab. 2014;18(1):23-31..

45. Singh R, Hamada A, Agarwal A .Thyroid Hormones in Male Reproduction and Fertility.

.Open Reprod Sci J. 2011;3:98-104.

46. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. J Androl. 2005;26(6):654-60.

47. Kanter M, Aktas C, Erboga M. Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis. Food Chem Toxicol. 2012;50(3-4):719-25.

48. Mohammadi S, Jalali M, Nikravesh MR, Fazel A, Ebrahimzadeh A, Gholamin M, et al. Effects of Vitamin-E treatment on CatSper genes expression and sperm quality in the testis of the aging mouse. Iran J Reprod Med. 2013;11(12):989-98.

49. Mohammadi S, Jalali M, Nikravesh M, Sankian M, Gholamin M, Fazel A, et al. Combination of vitamin E with L-carnitine increase CatSper Genes expression in the aging mouse testis. European Journal of Experimental Biology. 2013; (4):83-77.

50. Sabour M, Khoradmehr A, Kalantar SM, Danafar AH, Omidi M, Halvaei I, et al. Administration of high dose of methamphetamine has detrimental effects on sperm parameters and DNA integrity in mice. Int J Reprod Biomed (Yazd). 2017;15(3):161-8. PubMed PMID: 28580449. Pubmed Central

51. Pourentezari M, Talebi A, Abbasi A, Khalili MA, Mangoli E, Anvari M. Effects of acrylamide on sperm parameters, chromatin quality, and the level of blood testosterone in mice. Iran J Reprod Med. 2014;12(5):335-42.

52. Vaughan DA, Tirado E, Garcia D, Datta V, Sakkas D. DNA fragmentation of sperm: a radical examination of the contribution of oxidative stress and age in 16 945 semen samples. Human reproduction (Oxford, England). 2020 1;35(10):2188-96.

53. Mohammed Ali IA, AL-Ahmed HI, Ben Ahmed A. Evaluation of Green Synthesis (Withania somnifera) of Selenium Nanoparticles to Reduce Sperm DNA Fragmentation Diabetic Mice Induced with Streptozotocin. Applied Sciences. 2023;13(2):728.

54. Nguyen ND, Le MT, Tran NQT, Nguyen QHV, Cao TN. Micronutrient supplements as antioxidants in improving sperm quality and reducing DNA fragmentation. Basic and clinical andrology. 2023;33(1):23.

Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences
2023, Volume 11, No. 2: 1-13.

Original article

Comparative study of the effects of diabetes and hypothyroidism on sperm chromatin quality in adult mice

Elnaz Khordad[1,2], Mohammad Reza Nikravesh[2], Mehdi Jalali[2], Fatemeh Alipour[2]*, Farimah Beheshti[3]

1. Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Torbet Heydarieh University of Medical Sciences, Torbet Heydarieh, Iran

2. Department of Anatomical Sciences and Cell Biology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

3. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Torbat Heydarieh University of Medical Sciences, Iran

Corresponding author: Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad

Keywords:
Diabetes, hypothyroidism, chromatin, mice

Abstract

Background & Aim*:* Diabetes and abnormal thyroid function cause disorders in the reproductive system, which are associated with complications such as decreased testosterone, diameter of seminiferous tubule, libido, sperm motility, normal sperm morphology and fertility. It has been found that high blood sugar and decreased thyroid hormones may affect the quality of sperm and reduce the chances of male fertility. It has been also shown that changes in the sperm chromatin structure during the process of spermatogenesis is correlated with reduced number and motility or abnormal sperm morphology. Therefore, this study was designed to investigate the effects of diabetes and hypothyroidism on sperm chromatin quality.

***Methods*:** In this study, 60 Balb/C male mice were randomly divided into 5 groups: 1) control, 2) diabetic, 3) diabetes + insulin, 4) sham and 5) hypothyroid group. After 35 days, left epididymis were removed to assess sperm chromatin quality using aniline blue staining.

***Results*:** The results of this research showed that sperm chromatin integrity in the diabetic and hypothyroid groups significantly changed as increased the percentage of abnormal sperm chromatin and reduced chromatin quality compared to other groups ($P<0.05$) and insulin treatment improved this parameter compared to the diabetic group. ($P<0.05$).

***Conclusion*:** Our findings showed that diabetes and hypothyroidism have negative effects on chromatin integrity and suffering from the such diseases will probably increase infertility.

How to Cite this Article: Khordad E, Nikravesh MR, Beheshti F, Jalali M, Alipour F. Comparative study of the effects of diabetes and hypothyroidism on sperm chromatin quality in adult mice. Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2023;11(2):1-13.

Copyright © 2020 Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cite.