

Diabetik Ratlarda Selenyumun Spermatogenezi Koruyucu Etkisi

Dr. Ercüment Ulusoy *, Dr. İsmail Cinel **, Dr. Bülent Öztürk *, Dr. Leyla Memiş ***, Dr. Ali Memiş *, Dr. Mesut Çetinkaya *

ÖZET

Bu çalışmanın amacı diabetes mellitus'un spermatogenez yönünden testiste yol açtığı histopatolojik değişiklikleri ve selenyumun bunları önleyici rolü olup, olmadığını araştırmaktır.

Çalışmaya streptozosin ile diabetik hale getirilen 14 ve non-diabetik 15 Wistar rat (200-250gr) dahil edildi. Diabetik grupta 7, non-diabetik grupta 8 rata çalışma boyunca sodyum selenat tedavisi verildi. 12 hafta sonunda hayvanlar sakrifiye edilerek testisleri volüm ve histopatolojik değişiklikler yönünden incelendi.

Diabetik olup herhangi bir tedavi almayan grupta tüm ratlarda kontrol grubuna oranla belirgin hipospermatogenez tespit edilirken, sodyum selenat tedavisi alan diabetik ratlarda spermatogenetik aktivite kontrol grubundan farksızdı.

Sonuç olarak bulgularımız diabetes mellitus'un belirgin hipospermatogeneze yol açtığını ve selenyum tedavisinin spermatogenezi koruyucu rolü olabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: Diabetes mellitus, spermatogenez, selenyum

GİRİŞ

Diabetes mellituslu (DM) erkeklerde seksüel disfonksiyon yanısıra spermatogenezin de bozulduğu ve sperm kalitesinin düştüğü birçok çalışmada bildirilmiştir(1-3).

Reproduktif potansiyeli araştırmak amacıyla deneysel olarak DM oluşturulmuş ratlarda yapılan çalışmalarda seminal vezikül, prostat ağırlıklarında ve bunların total vücut ağırlığına oranında anlamlı azalma olduğu gösterilmiştir(4,5). Bazı araştırmacılar DM' nin ve vücut ağırlığındaki azalmanın testis volümünde belirgin azalmaya yol açtığını bildirirken (6,7), bazıları ise değişiklik olmadığını ileri sürmüşlerdir(8,9). Bu olumsuz etkilerin glukoz metabolizmasındaki değişiklikler sonucu mu yoksa androgen seviyelerindeki düşmeden mi kaynaklandığı henüz tam olarak açıklık kazanmamıştır.

Son zamanlarda birçok çalışmada artan serbest radikal aktivitesinin ve endotelial disfonksiyonun diabetik komplikasyonların oluşmasında rolü olduğu bildirilmiştir(10-12). DM'de serbest radikal oluşumunun kesin nedeni bilinmemekle birlikte, glukozun fizyolojik

SUMMARY

The protective effect of selenium on spermatogenesis in diabetic rats

The aim of this study is to investigate the pathological changes in testes due to diabetes mellitus with respect to spermatogenesis and whether selenium has a protective role on these or not.

Fourteen streptozotocin-induced diabetic and 15 non-diabetic wistar rats (200-250 gr) were included to the study. Sodium selenate was administered to 7 rats in diabetic group and 8 in non-diabetic group. At the end of 12 weeks, animals were sacrificed and the testes were evaluated with respect to volume and histopathological changes.

While there was an evident hypospermatogenesis in diabetic group with no treatment, spermatogenetic activite was found similar with controls in diabetic group treated with sodium selenate.

As a conclusion, our results revealed that diabetes mellitus causes an evident hypospermatogenesis and treatment of selenium may have a protective role on spermatogenesis.

Key words: Diabetes mellitus, spermatogenesis, selenium.

şartlarda oto-oksidasyonu ile hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerin oluştuğu bildirilmiştir(13).

Selenyum esansiyel bir element olup fonksiyonu net olarak anlaşılamamıştır. Ancak antioksidan rol oynayan glutatyon peroksidaz aktivitesi için gerekli olduğu (14), antioksidan gibi davrandığı (15) ve insülin benzeri etki oluşturduğu (16,17) gösterilmiştir.

Bu çalışmanın amacı DM'nin spermatogenez yönünden testiste yol açtığı histopatolojik değişiklikleri ve selenyumun bunları önleyici rolü olup olmadığını araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hayvan modeli : Çalışmaya toplam 29 erkek wistar rat (200-250gr) dahil edildi. Bütün ratlar ayrı kafeslerde ve aynı şartlarda saklandılar. Hayvanlar kontrollü odada(22±2°C), 12 saat artifisyal aydınlatma (06.00-18.00 saatleri arası) 12 saat karanlıkta tutuldular. Ratlar standart purina yemi (Ankara purina CO, Türkiye) ve yeterince su ile beslendiler. Başlangıç ağırlıkları

* S.B. Ankara Numune Hastanesi 2. Üroloji Kliniği

** Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD

*** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD



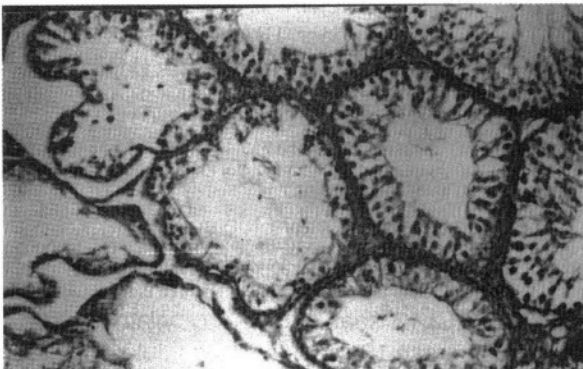
Resim 1: Kontrol grubunda seminifer tubulus kesitlerinde normal spermatogenetik aktivite (HE, X200).

kaydedildikten sonra çalışma sonuna kadar her hafta tartıldılar.

Hayvanlar rastgele dört gruba ayrıldılar. Diabetik grupta 14 rat mevcuttu (7 diabetik, 7 Diabetik+sodyum selenat ile tedavi edilen). Diabetik olmayan grupta ise 15 rat mevcuttu (7 kontrol, 8 kontrol+sodyum selenat ile tedavi edilen).

Diabetes mellitus oluşturulması: Ratlara 18-24 saat beslendikten sonra eter anestezisi altında kuyruk veninden 45 mg/kg streptozotisin 0.1 M sitrat tampon solüsyonunda çözünmüş halde (pH=4.5) verilerek DM oluşturuldu. Kontrol grubuna sadece M sitrat tampon solüsyonu verildi. Streptozotisin alan hayvanlarda enjeksiyonu takiben 48 saat içinde glikozüri poliüri ve polidipsi gelişti. Ratlar idrar örneklerinde Keto-Diastix test şeritleri (Ames CO, Division of Miles Laboratories, Elkhart, IN) kullanılarak en az 3+ glukoz tespit edilince ve glukometre ile kan şekeri ≥ 15 mM olduğunda DM'lu kabul edildiler. Ayrıca DM oluşturulan ratların sakrifiye edildiklerinde serum glukoz seviyeleri 400 mg/dl ve üzerindeydi.

Sodyum selenat (Aldrich, Milwaukee, WI) distile su içinde çözülmüş halde intraperitoneal olarak ilk 3 hafta 10 μ mol /kg /gün, ikinci 3 hafta 12.5 μ mol /kg/gün ve daha sonra 6 hafta 15 μ mol /kg/gün verildi.



Resim 2: Diabetik grupta germinal epitelde belirgin incelme ile karakterize hipospermatogenez alanları (HE, x200)

Sakrifiye edilen ratların her iki testisi de alınarak hassas terazi ile tartıldı.

Histopatolojik Değerlendirme:

Histopatolojik değerlendirme için deney hayvanlarının testis dokuları % 10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Doku örneklemesi sonrasında parafin bloklardan 5 mikronluk kesitler alınarak Hematoksilin-Eosin ve PAS (periodic acid-Schiff) boyası ile boyandı.

Tüm gruplara ait testis dokuları spermatogenezin morfolojik varyasyonları bakımından incelendi. Ek olarak seminifer tübüllerin bazal membranları, Leydig hücreleri ve vasküler komponent patolojik bulgu içermesi açısından gözden geçirildi.

İstatistiksel değerlendirmelerde Anova (Analysis of Variance) metodu kullanıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi ve gruplar arasındaki fark $p < 0.05$ olduğunda anlamlı kabul edildi.

SONUÇLAR

Ratlar sakrifiye edildiklerinde seviyeleri diabet ve diabet+ selenyum tedavisi alan gruplarda, kontrol ve kontrol+selenyum tedavisi alan gruplara oranla anlamlı derecede daha yüksek bulundu (sırasıyla, 618 ± 75 mg/dl, 605 ± 41 mg/dl, 208 ± 18 mg/dl, 210 ± 22 mg/dl) ($p < 0.05$). Buna ek olarak tedavi edilen ve edilmeyen DM'lu gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p > 0.05$).

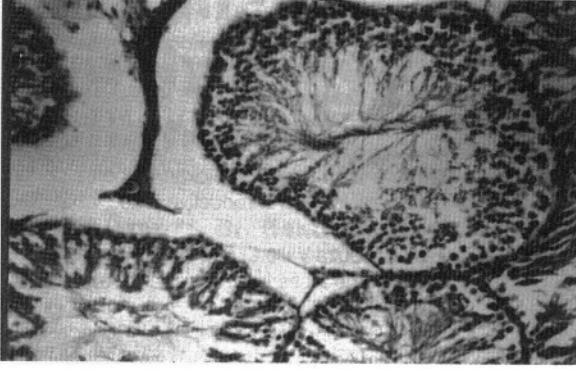
Total vücut ağırlıkları diabet ve diabet + selenyum tedavisi alan gruplarda, kontrol ve kontrol+selenyum tedavisi alan gruplara oranla anlamlı olarak düşüktü (sırasıyla, 195 ± 11 gr, 206 ± 18 gr, 329 ± 42 gr, 324 ± 30 gr) ($p < 0.05$). Tedavi edilen ve edilmeyen DM'lu gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p > 0.05$).

Diabet, diabet+selenyum tedavisi alan, kontrol ve kontrol +selenyum tedavisi alan gruplarda 12 haftalık çalışma sonunda testis volümleri yönünden istatistiksel bir fark yoktu (sırasıyla 3.14 ± 0.08 , 3.18 ± 0.09 , 3.22 ± 0.08 , 3.23 ± 0.13) ($p > 0.05$).

Diabetik ratların tümünde ($n=7$) testis dokuları incelendiğinde seminifer tübüllerin çaplarının kontrol grubuna oranla azaldığı ve germinal epitelin incelendiği izlendi. Bulgular, kesit üzerindeki tüm tübüller boyunca uniform olmamakla birlikte, yer yer tübüllerdeki germ hücre popülasyonunda ve lümendeki spermatid sayısında belirgin azalma gözlemlendi. (Şekil 1,2,3) Seminifer tübüllerin bazal membranları ve Leydig hücreleri patoloji içermemekteydi. İnterisyel vasküler komponent boyut ve sayı açısından normaldi. Kontrol +Na Selenat ve Diabetik+Na Selenat gruplarındaki deney hayvanlarının testis dokularında ise kontrol grubuna oranla spermatogenetik aktivite açısından herhangi bir fark saptanmadı.

TARTIŞMA

Bu çalışmada ortaya konmak istenen hayvan mod-



Resim 3: Selenyum ile tedavi edilen diabetik grupta normal spermatodenezin izlendiği seminifer tubulus kesiti (HE, X200)

eli üzerinde testiküler volüm ve histoloji kriter alınarak DM'un spermatogenez üzerine olumsuz etkileri ve selenyumun bu etkileri önlemedeki rolüdür. Streptozosin ile DM'lu hale getirilen ratlarda oluşan reproduktif fonksiyon bozukluklarının diabetik erkeklerdekine benzemesi (18) nedeniyle çalışmada ratlar tercih edilmiştir. Deneysel olarak DM oluşturulan ratlarda testis volümü değişiklikleri konusunda çelişkili bulgular mevcuttur. Bu çelişki muhtemelen kullanılan ratların değişik yaş ve ağırlıklarda olmasından kaynaklanmaktadır. Çünkü DM'un testis üzerine etkisi puberte öncesi veya esnasında (19) ve 200gr'ın altında vücut ağırlığı olan ratlarda daha şiddetli olmaktadır. Daha ağır hayvanlar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda testis volümlerinde bir değişiklik tespit edilmeyişinin nedeni 200-250 gr'lık adult ratların kullanılması olabilir.

DM'lu ratlarda yapılan histopatolojik çalışmalarda hipotalamo-hipofizer defektin ve spermatogenetik bozukluğun erken oluşmasına rağmen, Leydig hücre anomalileri Sertol hücrelerinde vakuolizasyon, tübül duvarında kalınlaşma (lamina propria ve bazal membran) ve intertisyal kompartmanda, çoğunluğunu kollajenin oluşturduğu ekstraselüler matriks artımı gibi diabetik değişikliklerin çok daha uzun sürelerde (150-200 gün) olduğu bildirilmiştir(22). Çalışmamızda 12 haftalık DM sonunda elde edilen histopatolojik bulgular bu bilgilerle uyumlu görünmektedir.

Bu çalışmada tedavi almayan DM'lu grupta belirgin hipospermatogenez tespit edilirken, selenyum ile tedavi edilen MDM'lu grupta ve kontrol gruplarında normal testiküler morfoloji tespit edilmiştir. DM'ta spermatogenez bozukluğunun hipotalamik disfonksiyon sonucu luteinizan hormon azalması (18), Leydig hücre fonksiyonu bozukluğu (7) veya glukoz metabolizması bozukluğu gibi sebeplerden olabileceği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda DM'lu grupta testisin volümü azalmadığı ve başka morfolojik değişiklik olmadığı halde belirgin hipospermatogenez tespit edilmesi ve antioksidan etkili selenyum tedavisi ile normal spermatogenez tespit edilmesi, DM'ta oluşan spermatogenetik bozuklukta daha önceden de diabetik ratlarda arttığı bildirilen (13) serbest radikallerin testis üzerine toksik etkilerinin de rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak 12 haftalık DM'lu ratlarda elde ettiğimiz bulgular, DM'un belirgin hipospermatogenez yol açtığını ve selenyum tedavisinin spermatogenez koruyucu rolü olabileceğini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

1. Schoffling K, Federlin D, Dikschuneit H, Pfeiffer EF. Disorders of sexual function in male diabetic. *Diabetes* 1963;12:519.
2. Bartak V, Josifko M, Horackova M. Juvenile diabetes and human sperm quality. *Int J Fertil* 1975;20:30.
3. Bartak V. Sperm quality in adult diabetic man. *Int J Fertil* 1979;24:226.
4. Murray FT, Orth J, Gunsalus G, Weisz J, Li JB, Jefferson LS, Musto NA, Bardin CW. The pituitary-testicular axis in the streptozocin diabetic male rat: evidence for gonadotroph, sertoli cell and leydig cell dysfunction. *Int J Androl* 1981;4:265.
5. Rossi GL, Bestelli G. Morphological changes in the hypothalamic-hypophysial-gonadal axis of male rats after twelve months streptozocin-induced diabetes. *Diabetologia* 1981;21:476.
6. Paz G, Homonnai ZT. Development of diabetic infertility induced by streptozocin in the male rat. *Int J Androl* 1979;2:182.
7. Hassan AA, Hassouna MM, Taketo T, Gagnon C, Elhilali MM. The effect of diabetes on sexual behaviour and reproductive tract function in male rats. *J Urol* 1993;149:148.
8. Paz G, Homonnai ZT, Hardl A, Kraicer PGF. Improvement in the fertility of streptozocin-diabetic male rats following treatment with insulin and human chorionic gonadotrophin. *Isr J Med Sci* 1978;14:1073.
9. Ford WCL, Hamilton DW. The effect of experimentally induced diabetes on the metabolism of glucose by seminiferous tubules and epididymal spermatozoa from the rat. *Endocrinology* 1984;115:716.
10. Faure P, Corticelli P, Richard MJ, Arnaud J, Coudary C, Halimi S, Favier A, Roussel AM. Lipid peroxidation and trace element status in diabetic ketotic patients: influence of insulin therapy. *Clin Chem* 1993;39:789.
11. Langenstroer P, Pieper GM. Regulation of spontaneous EDRF release diabetic rat aorta by oxygen free radicals. *Am J Physiol* 1992;263:257.

12. Yaqoob M, Patrick AW, Mac Clelland P, Stevenson A, Moon H, White MC, Bell CM. Relationship between markers of endothelial dysfunction, oxidant injury and tubular damage in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Sci* 1993;85:557.
13. Belay T, Cohen AR. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol* 1992;263:321.
14. Ratruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hofeman DG, Hoekstra WG. Selenium biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973;179:588.
15. Mc Keehan WL, Hamilton WG, Ham RG. Selenium is an essential trace nutrient for growth of WI-38 diploid human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:2023.
16. Ezaki O. The insulin-like effects of selenate in rat adipocytes. *J Biol Chem* 1990;265:1124.
17. Mc Neill JH, Delgatty HLM, Bottel ML. Insulin-like effects of sodium selenate in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 1991;40:1675.
18. Seethalakshmi L, Menon M, Diamon D. The effect of streptozocin-induced diabetes on the neuro-endocrine male reproductive tract axis of adult rat. *J Urol* 1987;138:190.
19. Paz G, Homonnai ZT, Drasnin N, Sofer A, Kaplan R, Kraicer PG. Fertility of streptozocin diabetic male rat. *Andologia* 1978;10:127.
20. Muckey BA, Hamilton DW. Effect of alloxan diabetes on the morphology of the male rat reproductive tract. *Anat Rec* 1981;199:177.
21. Tessone M, Biella De Souza Valle L, Foglia FG, Charreau EH. Endocrine function of the testis in streptozocin diabetic rats. *Acta Physiol Lat* 1976;26:387.
22. Murray FT, Cameron DF, Orth JM, Katovich MJ. Gonadal dysfunction in the spontaneously diabetic BB Rat: Alterations of testes morphology, serum testosterone and LH. *Horm Metabol Res* 1985;17:495.