Downloaded from journal.bums.ac.ir at 5:32 IRST on Friday February 23rd 2018

مقاله اصیل پژوهشی

نقش حفاظتی عصاره هیدروالکلی چای سبز (*Camellia sinensis*) بر پارامترهای اسپرم و بافت بیضه در موش‌های نژاد NMRI در معرض سدیم‌آرسنیت

سیّد محمدعلی شریعت‌زاده[1]، مریم محمدی[2]

چکیده

زمینه و هدف: سدیم‌آرسنیت، یک آلاینده زیست‌محیطی با توان تولید رادیکال آزاد و تخریب بافتی است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر عصاره چای سبز (GTE) به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان، بر پارامترهای اسپرم و بافت بیضه موش‌های تیمارشده با سدیم‌آرسنیت بود.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی، موش‌های نر بالغ نژاد NMRI، به‌طور تصادفی، در 4 گروه (n=6) شامل گروه‌های: کنترل، دریافت‌کننده سدیم‌آرسنیت (5 mg/kg/day)، دریافت‌کننده GTE (100mg/kg/day) و گروه دریافت‌کننده سدیم‌آرسنیت+ GTE قرار گرفتند و به‌مدّت 34 روز به‌صورت دهانی تیمار شدند. در پایان دوره تیمار، وزن بدن و بیضه چپ، ثبت و ناحیه دمی اپیدیدیم چپ، در محیط کشت Ham's F10 قطعه‌قطعه شد. اسپرم‌های خارج‌شده، برای بررسی برخی از پارامترهای اسپرم، مورد استفاده قرار گرفت. کیفیّت کروماتین اسپرم، توسط رنگ‌آمیزی‌های هسته‌ای آکریدین‌اورانژ و آنیلین‌بلو ارزیابی شد. بیضه چپ برای مشاهدات بافت‌آسیب‌شناختی مورد استفاده قرار گرفت. سطح مالون‌دی‌آلدئید (MDA) سرم، به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی اندازه‌گیری شد. داده‌ها با روش آماری One-Way ANOVA آنالیز شدند.

یافته‌ها: کاهش معنی‌داری در تعداد، تحرّک، قابلیت حیات (P<0/001) و مورفولوژی طبیعی‌اسپرم (P<0/01) و همچنین کاهش معنی‌داری در قطر لوله‌های منی‌ساز و ضخامت اپیتلیوم زایشی (P<0/001) در موش‌های تیمارشده با سدیم‌آرسنیت در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید. موش‌های تیمارشده با سدیم‌آرسنیت، افزایش معنی‌داری در قطر لومن لوله‌های منی‌ساز و سطح MDA (P<0/001) نشان دادند. پارامترهای فوق در گروه دریافت‌کننده سدیم‌آرسنیت+GTE به‌طور معنی‌داری جبران شد. سدیم‌آرسنیت، تأثیری بر وزن بدن و بیضه، قطر هسته اسپرماتوگونی،کیفیّت DNA اسپرم و جایگزینی پروتامین به‌جای هیستون نداشت.

نتیجه‌گیری: عصاره الکلی چای سبز (GTE)، احتمالاً می‌تواند تاحدودی در کاهش سمیّت ناشی از سدیم‌آرسنیت مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: بیضه؛ پارامترهای اسپرم؛ سدیم‌آرسنیت؛ عصاره چای سبز؛ موش

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. 1393؛ 21 (4): 432-443.

دریافت: 1393/05/28 اصلاح نهایی: پذیرش: 1393/09/09

[1] استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران؛

[2] نویسنده مسؤول؛ کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی تکوینی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، ایران؛

آدرس: اراک- دانشگاه اراک- دانشکده علوم پایه- گروه زیست شناسی 38156-8-8349

تلفن: 08643254128 نمابر: 0863-4173409 پست الکترونیک: Mohammadimaryam3286@gmail.com

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 5:32 IRST on Friday February 23rd 2018

مقدمه

انسان، در محیط زندگی و شغل خود با عواملی تماس دارد که می‌تواند عملکرد دستگاه تولید مثل را به خطر اندازد. دستگاه تولید مثل مردان به‌دلیل تقسیم سریع سلول‌های اسپرماتوگونی، نسبت به بسیاری از موادّ شیمیایی و عوامل فیزیکی که در اثر فعالیت‌های کشاورزی و صنعتی تولید می‌شوند، بسیار حساس است (1). در میان آلاینده‌های شیمیایی، آرسنیک (Arsenic) عنصری است که می‌تواند به‌وسیله انحلال از لایه‌های مختلف خاک، در آب‌های معدنی حضور داشته باشد. غلظت آرسنیک در منابع زمینی آب آشامیدنی، یکی از مهمترین مشکلات سلامت جهانی است. در آب آشامیدنی، آرسنیک غیرآلی به شکل‌های آرسنات (پنج‌ظرفیتی) و آرسنیت (سه‌ظرفیتی) یافت می‌شود. گزارش شده است که سمیّت ترکیبات آرسنیت بالاتر از آرسنات است؛ علاوه بر این، آرسنیک در ساخت علف‌کش‌ها، حشره‌کش‌ها، موادّ کشنده جوندگان، مواد نگهدارنده مواد غذایی و حتی داروها کاربرد دارد؛ از طرفی آرسنیک به‌عنوان یک مادّه سرطان‌زا مطرح است که قادر است از طرق مختلف از جمله: پوست، سیستم تنفس و گوارش، جذب و سلامتی انسان و حیوانات را تهدید نماید (2). یکی از ترکیبات آرسنیک، سدیم‌آرسنیت می‌باشد که مادّه‌ای بی‌بو و بی‌رنگ است. سدیم‌آرسنیت، یک آلاینده زیست‌محیطی می‌باشد و می‌تواند از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو، ناهنجاری‌هایی را در سیستم تولید مثلی نر القا کند. مسمومیّت آرسنیکی، در حیوانات آزمایشگاهی موجب ناتوانی در عملکرد سلول‌های لیدیگ شده و بدین‌ترتیب اثرات منفی را بر روی اسپرماتوژنز اعمال می‌نماید (3). تحقیقات نشان داده است که سدیم‌آرسنیت، موجب القای استرس‌اکسیداتیو در بافت‌های مختلف بدن ازجمله بیضه‌ها می‌شود. یکی از علل ناباروری در مردان، استرس‌اکسیداتیو و گونه‌های فعّال اکسیژن (ROS)[1] می‌باشد. این ترکیب، یک عامل اکسیدکننده از گروه رادیکال‌های آزاد است که تولید بیش از اندازه آن می‌تواند به اسپرم آسیب برساند (4). سدیم‌آرسنیت، اثر بازدارنده‌ای بر فعالیت آنزیم‌های استروئیدساز بیضه دارد و می‌تواند منجر به تغییر و اختلال در سطح هورمون‌های جنسی مثل: گنادوتروپین‌ها و تستوسترون شود (5، 6)؛ همچنین سدیم‌آرسنیت می‌تواند تعداد اسپرم‌های اپیدیدیم، قابلیّت حیات و تحرّک اسپرم‌ها و مورفولوژی طبیعی و فعالیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی را کاهش دهد (3، 5).

چای سبز، یکی از آشامیدنی‌های رایج در جهان است که حاوی کاتچین‌های مهم فعّال شامل: اپی‌گالوکاتچین‌گالات (EGCG)[2] و اپی‌گالوکاتچین (EC)[3] است (7). کاتچین، یکی از پلی‌فنل‌های موجود در چای سبز می‌باشد که فعالیّت آنتی‌اکسیدانی پلاسما را افزایش می‌دهد و ازبین‌برنده رادیکال‌های آزاد است. کاتچین- به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی- بر روی دستگاه تولید مثلی و همچنین بر روی تحریک تولید تستوسترون توسط سلول‌های لیدیگ، کاهش محتوی کل کلسترول، تری‌گلیسرید و فسفولیپید بافت بیضه اثر می‌گذارد و همچنین مانع از جهش‌زایی حاصل از موادّ شیمیایی جهش‌زا بر روی کروموزوم می‌گردد (8).

توانایی زنده‌ماندن، تحرّک و لقاح اسپرم، به‌شدّت وابسته به بیان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مؤثّر آنها در پلاسمای منی می‌باشد که چای سبز به‌علّت غنی‌بودن پلی‌فنل‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان قوی، باعث مهار اکسیژن واکنش‌پذیر و گونه‌های نیتروژن می‌شود که در نهایت موجب افزایش کیفیّت اسپرم می‌گردد (9).

از طرفی اثرات نامطلوب سدیم‌آرسنیت بر روی سیستم تولید مثلی نر ثابت شده است (3، 6). با توجه به نقش سمیّت سدیم‌آرسنیت بر سیستم تولید مثلی نر و با توجه به وسعت پراکندگی این مادّه در محیط زیست و خاصیّت قوی آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سبز، مطالعه حاضر به‌منظور

[1] *Reactive Oxygen Species*

[2] *Epigallocatechin gallate*

[3] *Epigallocatechin*

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 5:32 IRST on Friday February 23rd 2018

بررسی اثر عصاره هیدروالکلی چای سبز بر روی پارامترهای اسپرم و بافت بیضه موش‌های بالغ تیمارشده با سدیم‌آرسنیت صورت گرفت.

روش تحقیق

حیوانات و تیمار:

این تحقیق، بر روی موش‌های بالغ نژاد NMRI با وزن 30±5gr انجام شد. حیوانات، از انیستیتو پاستور ایران، خریداری و برای سازگاری با محیط، در شرایط استاندارد (دمای2±21 درجه سانتی‌گراد و نور محیطی با شرایط 12 ساعت تاریکی و 12 ساعت روشنایی)، به‌مدّت 2هفته با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. موش‌های بالغ، در 4 گروه (n=6 برای هر گروه) شامل: گروه کنترل (تیمار با آب)، گروه سدیم‌آرسنیت (5mg/kg/day) (5، 6)(تهیه‌شده از شرکت مرک آلمان)، گروه چای سبز (100mg/kg/day)(10)(تهیّه‌شده از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج) و گروه چای سبز+سدیم‌آرسنیت قرار گرفتند. تیمار، به‌صورت دهانی از طریق گاواژ به‌مدّت 34روز (طول دوره کامل اسپرماتوژنز در موش)(11) انجام گرفت. پس از پایان دوره تیمار، حیوانات، وزن شده و توسط دی‌اتیل‌اتر، بیهوش و سرانجام کشته شدند؛ سپس ناحیه دمی اپیدیدیم چپ آنها جدا شد تا برای آنالیز پارامترهای اسپرم، مورد استفاده قرار گیرند؛ همچنین بیضه چپ، خارج شد؛ بافت چربی از بیضه زدوده و وزن آن ثبت گردید.

بررسی تعداد اسپرم:

اپیدیدیم جداشده هر موش، به 1/5میلی‌لیتر محیط کشت Ham's F10 منتقل گردید و برای خروج اسپرم‌ها از آن محیط کشت، به چند قطعه برش داده شد. ده دقیقه بعد، 100میکرولیتر سوسپانسیون محیط کشت حاوی اسپرم، با 900میکرولیتر فیکساتیو فرمالین 2% (نسبت 1:9) رقیق شد. سپس سر اسپرم‌ها با استفاده از هموسیتومتر نئوبار، زیر میکروسکوپ، شمارش شد. شمارش اسپرم بر اساس دستورالعمل سازمان جهانی سلامت WHO[1] (WHO 1999) انجام شد و تعداد اسپرم در میلی‌لیتر مکعب محاسبه گردید.

بررسی قابلیّت تحرک اسپرم:

سنجش حرکت اسپرم بر اساس دستورالعمل WHO (WHO 1999) انجام شد؛ بدین‌ترتیب که ابتدا 10µl از سوسپانسیون محیط کشت و اسپرم روی لام چمبر منتقل و حرکات اسپرم در گروه‌های مختلف، زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی20× مورد بررسی قرار گرفت. حداقل 5 میدان دید میکروسکوپ برای تعیین قابلیّت تحرک 200 اسپرم برای هر موش بررسی و درصد اسپرم‌های دارای حرکات پیشرونده، حرکات درجا و بدون حرکت محاسبه گردید.

بررسی قابلیّت حیات اسپرم:

برای سنجش قابلیّت حیات اسپرم، بر اساس دستورالعمل WHO (WHO 1999)، رنگ‌آمیزی ائوزین-نکروزین صورت گرفت. به‌طور خلاصه، ائوزین 1% و نکروزین 10% (از شرکت مرک آلمان) در نرمال‌سالین آماده شد. نسبت یک‌حجم سوسپانسیون اسپرم و دو حجم ائوزین، در اپندورف مخلوط و پس از 30 ثانیه نگهداری در انکوباتور 37درجه سانتی‌گراد، حجم مساوی از محلول نکروزین به آن اضافه شد و گسترش نازکی از نمونه بر روی لام ایجاد گردید. پس از خشک‌شدن گسترش، با استفاده از میکروسکوپ معمولی با عدسی 100×، تعداد 100 اسپرم شمارش شد و نسبت درصد اسپرم در گروه‌های مختلف محاسبه گردید. در این رنگ‌آمیزی، سر اسپرم‌های زنده، سفید شد؛ در حالی که سر اسپرم‌های مرده به رنگ قرمز درآمد.

بررسی ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم:

به‌منظور بررسی مورفولوژی اسپرم، لام‌های ائوزین-نکروزین تهیه‌شده برای بررسی قابلیّت حیات اسپرم، مورد استفاده قرار گرفت. برای هر نمونه، 100اسپرم با بزرگنمایی

[1] *World Health Organization*

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 5:32 IRST on Friday February 23rd 2018

100× میکروسکوپ نوری بررسی و میزان ناهنجاری‌ها به‌صورت درصد بیان شد.

کیفیّت کروماتین اسپرم

رنگ‌آمیزی اکریدین‌اورانژ (AO):

گسترش نازکی از سوسپانسیون اسپرم، تهیّه و اجازه داده شد تا در مقابل هوا خشک شود. برای بررسی تمامیّت DNA اسپرم، از رنگ‌آمیزی اکریدین‌اورانژ (AO)[1] استفاده شد. رنگ‌آمیزی اکریدین‌اورانژ، براساس دستورالعمل شرح داده‌شده به‌وسیله Tejada و همکاران انجام شد (12)؛ به طور خلاصه، گسترش‌ها در محلول فیکساتیو متانول-اسیداستیک‌گلاسیال (به نسبت 3 به 1) به‌مدّت 14ساعت در دمای 4?C قرار داده شد و سپس به‌وسیله محلول رنگ‌کاری AO (رنگ 0/19% در بافر سیترات‌فسفات pH=2/5)، به‌مدّت 10دقیقه رنگ‌آمیزی گردید. لام‌های رنگ‌گرفته، به‌مدّت 5دقیقه با آب جاری شستشو داده شد و سپس در برابر هوا خشک گردیدند و با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس توسط فیلتر 450nm Reflector و با استفاده از عدسی ابژکتیو 100× مورد بررسی قرار گرفتند. اسپرم‌ها با توجه به میزان رنگ‌پذیری، در سه گروه شامل: اسپرم‌های سبزرنگ (با DNA طبیعی)، اسپرم‌های زردرنگ (حالت حدّ واسط) و اسپرم‌های قرمزرنگ (با DNA دناتوره تک‌رشته‌ای) بررسی شدند.

نمونه کنترل مثبت:

به‌منظور کنترل روش مذکور، از نمونه‌های کنترل مثبت استفاده شد؛ بدین‌منظور نمونه‌های اسپرم، از حیوان سالم و بالغ گرفته شد و سپس DNA این اسپرم‌ها، تحت تأثیر حرارت بالا (90 درجه سانتی‌گراد) به‌مدّت30 دقیقه دناتوره شد و پس از تهیه گسترش، نمونه‌ها به روش اشاره‌شده در فوق رنگ‌آمیزی شدند.

رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو:

برای بررسی جایگزینی هیستون- پروتامین اسپرم، گسترش‌ها به‌وسیله آنیلین‌بلو (AB)[2] رنگ‌آمیزی شدند. رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو براساس دستورالعمل شرح داده‌شده به‌وسیله Wongand و همکاران انجام شد (13). به‌طور خلاصه، گسترش‌های اسپرم تهیه‌شده، به‌مدّت 5دقیقه در محلول فرمالین 4% ثابت شدند. لام‌ها، پس از شستشو با آب، در محلول آنیلین‌بلو (آنیلین‌بلو 5% در اسیداستیک 4%، pH=3/5)، به‌مدّت 5دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشو با آب، لام‌ها در ائوزین 0/5% به‌مدّت یک‌دقیقه قرار گرفتند و به‌طور مجدد با آب، شسته و در مجاورت هوا خشک شدند. لام‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری و ابژکتیو 100× بررسی گردیدند. اسپرم‌ها با توجه به میزان رنگ‌پذیری در دو گروه بررسی شدند: اسپرم‌های نابالغ با پروتئین‌های هیستون هسته‌ای (غنی از لیزین) به رنگ آبی تیره و اسپرم‌های بالغ با پروتامین‌ها (غنی از سیستئین و آرژنین) به رنگ قرمز-صورتی (red-pink).

نمونه کنترل مثبت:

به‌منظور کنترل روش مذکور، از نمونه‌های کنترل مثبت استفاده شد؛ بدین‌منظور بیضه‌های موش نابالغ، در محیط کشت قطعه‌قطعه شد و از سوسپانسیون محیط کشت گسترش‌هایی تهیه گردید و به‌روش اشاره‌شده در فوق رنگ‌آمیزی شد.

آماده‌سازی نمونه برای بررسی بافت بیضه:

بیضه چپ، بعد از خروج از بدن حیوان، در فیکساتیو MDF[3] قرار داده شد (14)؛ سپس برش‌گیری و پاساژ بافتی انجام شد. سرانجام به‌منظور بررسی تغییرات هیستومورفولوژیکی بیضه، لام‌های 5میکرونی با روش هایدن‌هاین‌آزان (Heiden hain Azan) رنگ‌آمیزی شدند.

[1] *Acridine orange*

[2] *Aniline blue*

[3] *Modified Davidson's Fluid*

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 5:32 IRST on Friday February 23rd 2018

اندازه‌گیری قطر لوله‌های منی‌ساز، قطر لومن، ضخامت اپیتلیوم زایشی و قطر هسته اسپرماتوگونی با استفاده از نرم افزار موتیک:

به‌منظور محاسبه میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز، قطر لومن، قطر هسته سلول‌های اسپرماتوگونی و ضخامت اپیتلیوم زایشی، به این ترتیب عمل شد که ابتدا از اسلایدهای 5میکرونی بافت بیضه، به‌صورت تصادفی، تعدادی فیلد انتخاب و توسط میکروسکوپ مدل Olympus BX41TE عکس‌برداری شد؛ سپس قطر لوله‌های منی‌ساز، قطر لومن، قطر هسته سلول‌های اسپرماتوگونی و ضخامت اپیتلیوم زایشی، به کمک نرم‌افزار موتیک (Motic image 2000) اندازه‌گیری و ثبت گردید.

بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدی از طریق سنجش مالون‌دی‌آلدئید (MDA):

برای اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید، از روش Buege و Aust استفاده شد. ابتدا یک محلول TCA-TBA-HCL، شامل: تری‌کلرواستیک‌اسید (Trichloroacetic (TCA) acid) 15% (gr/ml)، تیوباربیوتیک‌اسید (TBA) (Thiobarbituric acid) 0/375% (gr/ml) و اسیدکلریدریک 0/25 نرمال، تهیّه شد؛ سپس 0/5میلی‌لیتر از نمونه سرم خونی، با یک میلی‌لیتر از محلول TBA-HCL -TCA مخلوط و به‌مدّت 15دقیقه در بن‌ماری جوش، قرار داده شد. نمونه‌ها، بعد از خروج از بن‌ماری، به‌مدّت 10دقیقه سانتریفوژ شدند و مایع رویی آنها به‌دقّت جدا شد و جذب آن در 532نانومتر در برابر blank که حاوی تمام ترکیبات به استثنای نمونه بود، خوانده شد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) (Malondialdehyde) با استفاده از ضریب خاموشی (cxtinction coefficient) آن که عبارت است از $1/56 \times 10^5 M^{-1} Cm^{-1}$ محاسبه گردید و برحسب نانومول بر میلی‌لیتر (nmol/ml) بیان شد (15، 16).

روش آماری آنالیز داده‌ها:

داده‌های حاصل، توسط نرم‌افزار SPSS (ویرایش 16) و با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) و آزمون متعاقب Tukey، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح P<0/05 معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

وزن بدن و بیضه:

برای هر موش، وزن بدن و بیضه‌ها در پایان دوره تیمار اندازه‌گیری شد. هیچ اختلاف معنی‌داری در میانگین وزن بدن و بیضه‌ها در بین چهار گروه وجود نداشت (P>0/05)(جدول 1).

قابلیّت تحرّک اسپرم:

در موش‌های تیمارشده با سدیم‌آرسنیت، میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکات جلورونده، نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافت (P<0/001) و میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکات درجا و ساکن در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد (P<0/001). در گروه سدیم‌آرسنیت+عصاره چای سبز نسبت به گروه سدیم‌آرسنیت، یک افزایش معنی‌داری (P<0/001) در میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکات جلورونده و یک کاهش معنی‌داری (P<0/001) در میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکات درجا و ساکن تا حدّ گروه کنترل مشاهده شد (جدول 2).

جدول 1- مقایسه میانگین وزن بدن و بیضه موش در گروه‌های مختلف، 34 روز پس از تیمار با سدیم‌آرسنیت و عصاره چای سبز (میانگین± انحراف‌معیار)

گروه‌ها	کنترل	سدیم‌آرسنیت	سدیم‌آرسنیت+چای سبز	چای سبز	سطح معنی‌داری
وزن موش در پایان دوره تیمار (گرم)	35/95±3/64	34/55±2/40	34/63±3/36	36/72±1/72	0/57
وزن بیضه (گرم)	0/13± 0/02	0/12±0/02	0/12±0/02	0/13±0/03	0/66

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 5:32 IRST on Friday February 23rd 2018

تعداد اسپرم:

بر طبق نتایج این مطالعه، میانگین تعداد اسپرم‌های اپیدیدیم در گروه سدیم‌آرسنیت در مقایسه با گروه کنترل، به‌طور معنی‌داری (P<0/001) کاهش یافت؛ ازطرفی میانگین تعداد اسپرم در گروه سدیم‌آرسنیت+عصاره چای سبز در مقایسه با گروه سدیم‌آرسنیت افزایش معنی‌داری نشان داد (P<0/001)(جدول3).

قابلیّت حیات اسپرم:

میانگین درصد اسپرم‌های زنده که معادل قابلیّت حیات اسپرم می‌باشد، در گروه تیمارشده با سدیم‌آرسنیت در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافت (P<0/001)؛ از طرفی قابلیّت حیات اسپرم در گروه سدیم‌آرسنیت+عصاره چای سبز در مقایسه با گروه سدیم‌آرسنیت، افزایش معنی‌داری را نشان داد (P<0/001). به عبارت دیگر، به‌نظر می‌رسد در گروه سدیم‌آرسنیت+عصاره چای سبز، عصاره چای سبز توانسته است اثرات مخرّب سدیم‌آرسنیت را درخصوص قابلیّت حیات اسپرم در مقایسه با گروه سدیم‌آرسنیت به‌طور معنی‌داری جبران نماید (جدول3).

ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم:

موش‌های تیمارشده با سدیم‌آرسنیت، افزایش معنی‌داری در ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم نشان دادند (P<0/001). در گروه سدیم‌آرسنیت+عصاره چای سبز، عصاره چای سبز توانسته است، به‌طور معنی‌داری ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم را در مقایسه با گره سدیم‌آرسنیت کاهش دهد (P<0/001)(جدول 3). تعدادی از ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم شامل: قطره سیتوپلاسمی، سر آمورف (amorphous head) و دم پیچیده در گروه سدیم‌آرسنیت وجود دارد که در شکل یک نشان داده شده است.

جدول 2- مقایسه میانگین قابلیت تحرک اسپرم در گروه‌های مختلف، 34روز پس از تیمار با سدیم‌آرسنیت و عصاره چای سبز (میانگین±انحراف‌معیار)

گروه‌ها	کنترل	سدیم‌آرسنیت	سدیم‌آرسنیت+چای سبز	چای سبز	سطح معنی‌داری
جلورونده(درصد)	68/32± 2/06	55/85±3/84 a	66/94±2/05 b	72/21±2/24	P<0/001
درجا(درصد)	19/94±0/64	27/21±2/59 a	21/64±2/40b	17/77±2/02	P<0/001
ساکن(درصد)	11/74±1/82	16/94±2/09 a	11/44±1/57 b	10/02±1/30	P<0/001

a: مقایسه آماری گروه سدیم‌آرسنیت نسبت به گروه کنترل (P<0/001)

b: مقایسه آماری گروه سدیم‌آرسنیت+چای سبز نسبت به گروه سدیم‌آرسنیت (P<0/001)

جدول 3- مقایسه میانگین تعداد، قابلیت حیات و مورفولوژی طبیعی اسپرم در گروه‌های مختلف، 34 روز پس از تیمار با سدیم‌آرسنیت و عصاره چای سبز (میانگین±انحراف‌معیار)

گروه‌ها	کنترل	سدیم‌آرسنیت	سدیم‌آرسنیت+چای سبز	چای سبز	سطح معنی‌داری
مورفولوژی طبیعی اسپرم (درصد)	97/91±0/73	96/60±0/45 a1	97/74±0/37 b1	98/18±0/54	0/008
قابلیت حیات اسپرم (درصد)	77/31±2/11	61/03±3/42 a2	77/00±2/21 b2	80/43±2/14	P<0/001
تعداد اسپرم (×106)	10/42±1/30	6/00±1/13 a2	10/35±3/50 b2	11/38±5/19	P<0/001

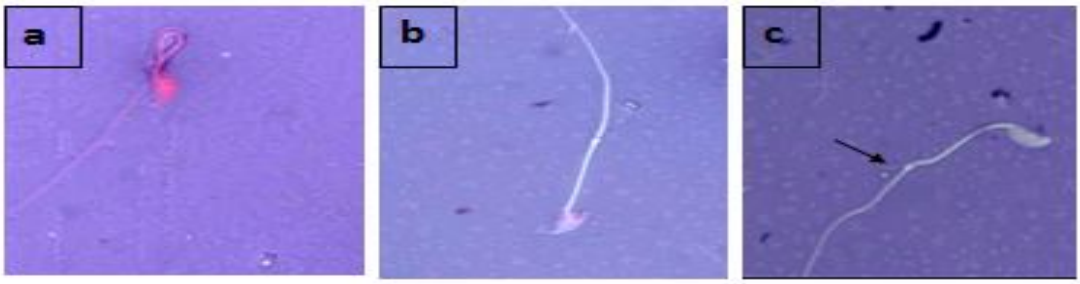
a: مقایسه آماری گروه سدیم آرسنیت نسبت به گروه کنترل a1 : (P<0/01)، a2: (P<0/001)

b: مقایسه آماری گروه سدیم آرسنیت+چای سبز نسبت به گروه سدیم‌آرسنیت. b1: (P<0/01)، b2: (P<0/001)

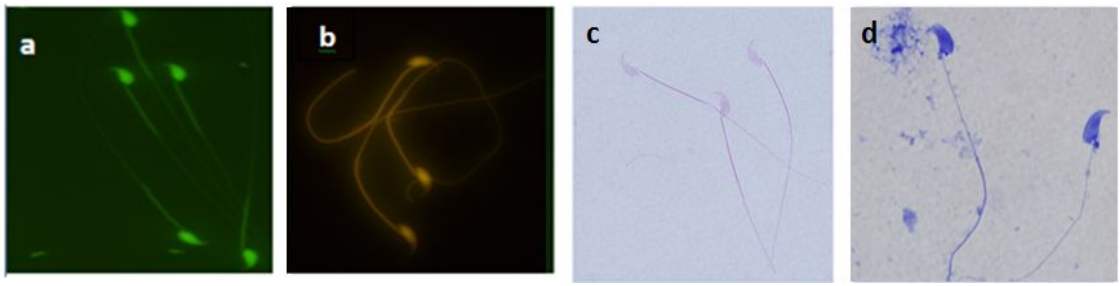
Downloaded from journal.bums.ac.ir at 5:32 IRST on Friday February 23rd 2018

کیفیّت کروماتین اسپرم:

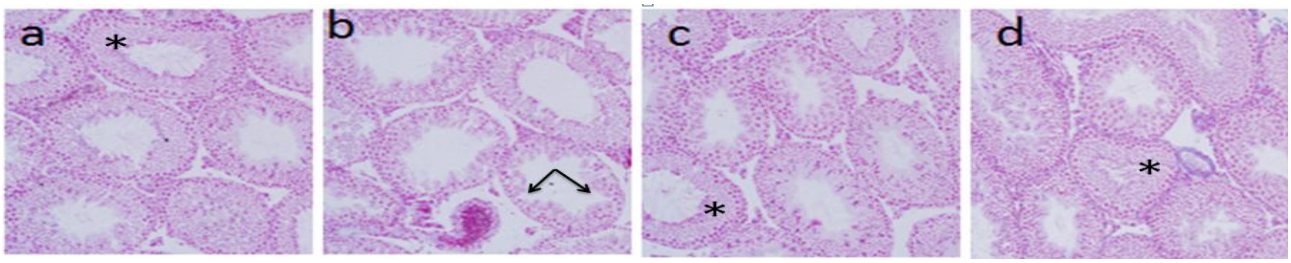
رنگ‌آمیزی گسترش‌های اسپرمی با AO نشان داد که تیمار موش‌ها با سدیم‌آرسنیت، در مقایسه با گروه کنترل، تأثیری روی دناتوره‌شدن ساختمان دورشته‌ای DNAی اسپرم نداشت. برعکس، نمونه‌های کنترل مثبت شامل اسپرم‌هایی که DNA آنها توسط حرارت بالا دناتوره شده بودند، به رنگ نارنجی ظاهر شدند (شکل 2a-b)؛ علاوه بر این، رنگ‌آمیزی گسترش‌های اسپرمی با AB، بیانگر این بود که تیمار موش‌ها با سدیم‌آرسنیت در مقایسه با گروه کنترل، تأثیری روی جایگزینی هیستون با پروتامین در هسته طی فرایند بلوغ اسپرم نداشت. برعکس، نمونه‌های کنترل مثبت که از حیوان نابالغ (حاوی مقدار زیادی پروتئین هیستون) گرفته شده بود، به رنگ آبی ظاهر شدند (شکل 2c-d).



شکل 1- برخی از ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم در گروه تیمارشده با سدیم‌آرسنیت (5mg/kg/day)، رنگ‌آمیزی ائوزین-نکروزین، بزرگنمایی100× (a): دم پیچیده یا مجعد (Coiled or curled). (b): سرآمورف (amorphous head) (c): قطره سیتوپلاسمی



شکل2- اسپرم‌های رنگ‌آمیزی‌شده توسط آکریدین‌اورانژ و آنیلین‌بلو، بزرگنمایی100×. رنگ‌آمیزی آکریدین‌اورانژ (a): گروه سدیم‌آرسنیت (5mg/kg/day). (b): نمونه کنترل مثبت. رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو. (c): گروه سدیم‌آرسنیت (5 mg/kg/day). (d): نمونه کنترل مثبت.



شکل3- تصاویر میکروسکوپی از بافت بیضه موش‌های بالغ در گروه‌های مختلف تیمارشده با سدیم‌آرسنیت (5mg/kg/day) و عصاره چای سبز (100mg/kg/day). برش‌های 5 میکرونی، رنگ‌آمیزی هایدن-هاین آزان، بزرگنمایی 10× نشان‌دهنده: (a): ساختمان طبیعی بافت بیضه در موش‌های گروه کنترل با آرایش و اندازه طبیعی ضخامت اپیتلیوم زایشی (ستاره). (b): دژنره و واکوئل‌دار شدن همراه با کاهش ضخامت اپیتلیوم زایشی، تخریب اسپرماتوژنز و افزایش در قطر لومن توبول در گروه سدیم‌آرسنیت (نوک پیکان). (c): آرایش تقریباً طبیعی اپیتلیوم زایشی و اسپرماتوژنز طبیعی در گروه عصاره چای سبز+سدیم‌آرسنیت (ستاره). (d): نمای لوله‌های منی‌ساز شبیه به گروه کنترل در گروه عصاره چای سبز (ستاره).

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 5:32 IRST on Friday February 23rd 2018

جدول 4- مقایسه میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز، قطرلومن، قطر هسته سلول‌های اسپرماتوگونی و ضخامت اپیتلیوم زایشی (µm) در بافت بیضه و میانگین میزان مالون‌دی‌آلدئید درگروه‌های مختلف، 34 روز پس از تیمار با سدیم‌آرسنیت و عصاره چای سبز (میانگین±انحراف‌معیار)

گروه‌ها	کنترل	سدیم‌آرسنیت	سدیم‌آرسنیت+چای سبز	چای سبز	سطح معنی‌داری
قطر لوله منی‌ساز (µm)	182/23±2/50	156/33±3/83 [a]	180/76±4/55[b]	185/63±4/26	P<0/001
قطر لومن (µm)	76/70±4/67	98/35±1/98 [a]	78/29±2/23[b]	73/31±3/84	P<0/001
ضخامت اپیتلیوم زایشی (µm)	56/02±1/11	36/05±1/79[a]	55/22±1/52[b]	57/48±2/01	P<0/001
قطر هسته اسپرماتوگونی (µm)	4/72±0/04	4/68±0/03	4/70±0/03	4/76±0/08	0/69
مالون‌دی‌آلدئید (MDA)(nmol/ml)	4/22±0/30	6/20±0/24 [a]	4/48±0/44 [b]	4/19±0/50	P<0/001

a: مقایسه آماری گروه سدیم‌آرسنیت نسبت به گروه کنترل (P< 0/001)

b: مقایسه آماری گروه سدیم آرسنیت+چای سبز نسبت به گروه سدیم‌آرسنیت (P<0/001)

قطر لومن، قطر لوله‌های منی‌ساز، قطر هسته سلول‌های اسپرماتوگونی و ضخامت اپیتلیوم زایشی (µm):

در گروه کنترل، لوله‌های منی‌ساز، ساختار معمولی داشتند (شکل 3a). در گروه سدیم‌آرسنیت، دیواره لوله‌های منی‌ساز نامنظم شده و همچنین ضخامت دیواره لوله‌های منی‌ساز کاهش یافته بود (شکل 3b)؛ در این گروه، یک کاهش معنی‌داری در قطر لوله‌های منی‌ساز و ضخامت اپیتلیوم زایشی و افزایش معنی‌داری در قطر لومن لوله‌های منی‌ساز در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (P<0/001). هیچ تغییر معنی‌داری در قطر هسته اسپرماتوگونی در بین گروه‌ها مشاهده نشد (P=0/69)(جدول 4).

در گروه سدیم‌آرسنیت+عصاره چای سبز، عصاره چای سبز توانست تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از سدیم‌آرسنیت را در بافت بیضه بهبود بخشد؛ به عبارت دیگر، عصاره چای سبز توانست تاحدودی تغییرات نامطلوب در قطر لوله‌های منی‌ساز و قطر لومن لوله‌های منی‌ساز و ضخامت اپیتلیوم زایشی را که در بافت بیضه موش‌های تیمارشده با سدیم‌آرسنیت ایجاد شده بود، ترمیم نماید (شکل3c)(P<0/001).

بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدی از طریق سنجش مالون‌دی‌آلدئید (MDA):

مقایسه میزان مالون‌دی‌آلدئید سرم در گروه سدیم‌آرسنیت نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد (P<0/001)؛ از طرفی میزان مالون‌دی‌آلدئید سرم در گروه سدیم‌آرسنیت+عصاره چای سبز، در مقایسه با گروه سدیم‌آرسنیت، کاهش معنی‌داری نشان داد (P<0/001)؛ به‌عبارت دیگر، به‌نظر می‌رسد که در گروه سدیم‌آرسنیت+عصاره چای سبز، عصاره چای سبز توانسته است میزان پراکسیداسیون لیپیدی را در مقایسه با گروه سدیم‌آرسنیت، به‌طور معنی‌داری کاهش دهد (جدول 4).

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سدیم‌آرسنیت بر روی پارامترهای اسپرم اپیدیدیم و بافت بیضه موش‌های بالغ، اثرات نامطلوبی اعمال می‌کند؛ علاوه براین، نشان داده شد که عصاره چای سبز، اثر سمّی سدیم‌آرسنیت بر روی این پارامترها را جبران می‌کند. در مطالعه حاضر، هیچ اختلاف معنی‌داری در وزن بیضه‌ها و بدن، در موش‌های تیمارشده با سدیم‌آرسنیت مشاهده نشد. نتایج ما با یافته‌های قبلی در مورد اثر سدیم‌آرسنیت بر روی وزن بیضه‌ها (17) و بدن (18) همخوانی دارد. هر چند در برخی از مطالعات، کاهش وزن

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 5:32 IRST on Friday February 23rd 2018

بیضه‌ها و بدن در حیوانات تیمارشده با سدیم‌آرسنیت گزارش شده است (5 ،6)؛ این نتایج ممکن است به‌دلیل مدّت‌زمان تیمار یا دوزهای متفاوت سدیم‌آرسنیت باشد (18). در توافق با مطالعات قبلی (3)، نتایج پژوهش حاضر همچنین کاهش معنی‌داری در تعداد کلّ اسپرم‌ها در موش‌های تیمارشده با سدیم‌آرسنیت نشان داد. یک احتمال برای این اثر، ممکن است به‌دلیل کاهش هورمون‌هایی مثل: LH، FSH و تستوسترون باشد که در کاهش تعداد اسپرم‌ها مؤثّر هستند (5)؛ از سوی دیگر گزارش شده است که سدیم‌آرسنیت به‌وسیله القای استرس اکسیداتیو، اثرات مضرّی روی اندام‌های مختلف از جمله بیضه‌ها اعمال می‌کند (3)؛ بنابراین فرض‌شده است که کاهش تعداد اسپرم می‌تواند از استرس اکسیداتیو القاشده توسط سدیم‌آرسنیت ناشی شود؛ از طرفی در گروه سدیم‌آرسنیت+عصاره چای سبز، چای سبز به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان (19)، اثر مضر سدیم‌آرسنیت بر روی تعداد اسپرم را جبران می‌کند. نتایج پژوهش حاضر، نشان‌دهنده کاهش در قابلیّت حیات و قابلیّت تحرّک اسپرم‌های اپیدیدیمی بود. یک احتمال در کاهش قابلیّت حیات اسپرم می‌تواند ناشی از تأثیر سدیم‌آرسنیت بر روی میتوکندری‌های اسپرم باشد. این احتمال وجود دارد که سدیم‌آرسنیت، با ایجاد استرس اکسیداتیو و در پی آن پراکسیداسیون لیپید، منجر به تغییر در تراوایی غشا و یا تغییر پتانسیل غشای میتوکندری‌ها شده باشد که به‌نوبه خود منجر به آزادشدن فاکتورهای آپوپتوژنیک مثل: سیتوکروم c و فاکتور القاکننده آپاپتوزیس (Apoptosis inducing factor) از میتوکندری‌ها می‌شود. همچنین این آلاینده ممکن است با ایجاد اختلال در عملکرد میتوکندری‌ها، موجب اختلال در فرآیند فسفوریلاسیون اکسیداتیو در این اندامک شده و منجر به تخلیه ATP (20) در اسپرم شود و در نهایت منجر به کاهش قابلیّت حیات اسپرم شده باشد. سدیم‌آرسنیت همچنین قادر است با اتصال به لیگاندهای حاوی سولفور، باعث ایجاد اختلال و کاهش در فعالیت آنزیم‌های سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانت شود (21) و این امر می‌تواند در تشدید اثرات اکسیداتیو سدیم‌آرسنیت روی کاهش قابلیّت حیات اسپرم مؤثّر باشد. کروماتین و تاژک در اسپرم پستانداران، شامل مقادیر زیادی پروتامین غنی از تیول و گروه‌های سولفیدریل می‌باشد که به‌ترتیب در نگهداری از ثبات و قابلیّت تحرّک اسپرم دخالت دارند. احتمالاً کاهش در قابلیّت تحرّک اسپرم که در این تحقیق مشاهده شد، ممکن است به‌دلیل اتصال آرسنیک به گروه‌های تیول یا سولفیدریل پروتئین‌های اسپرم یا مهار آنزیم‌های میتوکندریایی مسؤول حرکت اسپرم باشد (3)؛ از طرفی، القای استرس‌اکسیداتیو توسط سدیم‌آرسنیت و پراکسیدشدن اسیدهای چرب غشا، منجر به ازدست‌رفتن سیالیت غشا و کاهش در فعالیّت آنزیم‌های غشا و کانال یونی و در نتیجه ازدست‌رفتن تدریجی تحرّک و توانایی اسپرم‌ها برای اتصال به اووسیت می‌شود (22). احتمال داده شده است که کاهش قابلیّت حیات و تحرّک اسپرم توسط سدیم‌آرسنیت، از توانایی این سم در القای استرس اکسیداتیو ناشی می‌شود. عصاره چای سبز به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی، با مهار استرس‌اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپید را در اسپرم کاهش داده و بدین‌ترتیب از مرگ اسپرم‌ها جلوگیری می‌نماید و همچنین از طریق افزایش سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی، موجب افزایش قابلیّت حیات و تحرّک اسپرم در گروه سدیم‌آرسنیت+عصاره چای سبز نسبت به گروه سدیم آرسنیت می‌شود (23). نتایج حاصل، افزایش قابل‌توجّهی در ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم از جمله: دم پیچیده و سرآمورف در موش‌های تیمارشده با سدیم‌آرسنیت نشان داد. این نشان می‌دهد که تولید ROS توسط سدیم‌آرسنیت، می‌تواند ناهنجاری‌های مورفولوژیکی را در اسپرم القا کند (24).

با استفاده از رنگ‌آمیزی اکریدین‌اورنژ و آنیلین‌بلو، موش‌های تیمارشده با سدیم‌آرسنیت، هیچ اختلاف معنی‌داری در کیفیت DNA اسپرم و جایگزینی هیستون-پروتامین نشان ندادند. آرسنیک، یک مخرّب قوی غدد درون‌ریز است (25)؛ بنابراین احتمال دیگر برای تغییر پارامترهای اسپرم در این

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 5:32 IRST on Friday February 23rd 2018

تحقیق، ممکن است با این خاصیت آرسنیک مرتبط باشد. افزایش در قطر لومن لوله‌های منی‌ساز که با کاهش تجمع اسپرم مرتبط است، ممکن است به‌دلیل کاهش سطوح گنادوتروپین‌ها و به‌خصوص تستوسترون در اثر تیمار با آرسنیک باشد (3، 5)؛ از طرفی افزایش غلظت MDA سرم خونی در مطالعه ما در گروه سدیم‌آرسنیت در مقایسه با سایر گروه‌ها که نشان‌دهنده افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و برهم‌خوردن تعادل اکسیدانتی در این گروه است، می‌تواند تأییدکننده نتایج دیگر ما در این مطالعه باشد که سدیم‌آرسنیت با ویژگی استرس اکسیداتیوی خود توانسته است بر پارامترهای اسپرم، اثر سوء بگذارد.

نتیجه‌گیری

سدیم‌آرسنیت، به‌عنوان یک آلاینده زیست‌محیطی قوی مطرح است. نتایج حاصل از این مطالعه، نشان‌دهنده اثرات نامطلوب این آلاینده بر تعداد، قابلیّت تحرّک، قابلیّت حیات، مورفولوژی طبیعی اسپرم و همچنین قطر لوله‌های منی‌ساز، قطر لومن و ضخامت اپیتلیوم زایشی است؛ ازطرفی سدیم‌آرسنیت، هیچ تأثیری روی کیفیّت DNA اسپرم و جایگزینی پروتامین به‌جای هیستون در موش‌های بالغ تیمارشده با این ماده سمّی نداشت؛ همچنین، نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره چای سبز قادر است تاحدودی اثرات مضر سدیم‌آرسنیت بر روی تعداد، قابلیّت تحرّک، قابلیّت حیات، مورفولوژی اسپرم و بافت بیضه را جبران نماید.

تقدیر و تشکر

این مقاله، حاصل پایان‌نامه خانم مریم محمدی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی سلولی تکوینی از دانشکده علوم پایه دانشگاه اراک بود. بدین‌وسیله از مسؤولین مربوطه تشکر به‌عمل می‌آید؛ همچنین از کمک‌های ارزشمند سرکار خانم سمیرا نادری نورعینی در این مطالعه صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع:

1- Paul M, Frazier L. Reproductive Disorders. In: Levy BS, Wegman DH. Occupational Health: Recognizing and Preventing Work-Related Disease. 4th ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2000. pp: 590-3.

2- Wang TC, Jan KY, Wang AS, Gurr JR. Trivalent arsenicals induce lipid peroxidation, protein carbonylation, and oxidative DNA damage in human urothelial cells. Mutat Res. 2007; 615(1-2): 75-86.

3- Momeni HR, Eskandari N. Effect of vitamin E on sperm parameters and DNA integrity in sodium arsenite-treated rats. Iran J Reprod Med. 2012; 10(3): 249-56.

4- Shi H, Shi X, Liu KJ . Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. Mol Cell Biochem. 2004; 255 (1-2): 67-78.

5- Jana K, Jana S, Samanta PK. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. Reprod Biol Endocrinol. Reprod Biol Endocrinol. 2006; 4: 9.

6- Sarkar M, Chaudhuri GR, Chattopadhyay A, Biswas NM. Effect of sodium arsenite on spermatogenesis, plasma gonadotrophins and testosterone in rats. Asian J Androl. 2003; 5(1): 27-31.

7- Sano M, Takahashi Y, Yoshino K, Shimoi K, Nakamura Y, Tomita I, et al. Effect of tea (Camellia sinensis L.) on lipid peroxidation in rat liver and kidney: a comparison of green and black tea feeding. Biol Pharm Bull. 1995; 18(7): 1006-8.

8- Zhang Q, Kelly AP, Wang L, French SW, Tang X, Duong HS, et al. Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibit mast cell-stimulated type I collagen expression in keloid fibroblasts via blocking PI-3K/AkT signaling pathways. J Invest Dermatol. 2006; 126(12): 2607-13.

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 5:32 IRST on Friday February 23rd 2018

9- Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. J Nutr. 2003; 133(10): 3275S-84S.

10- Patil LJ, SB Bothara, Balaraman R. Effect of chronic administration of green tea extract on chemically induced electrocardiographic and biochemical changes in rat heart. Int J Green Pharm. 2010; 4(3): 170-3.

11- Cutright PR. The spermatogenesis of the mouse (mus musculus, var. albula). J Morphol. 1932; 54(1): 197-220.

12- Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. Fertil Steril. 1984; 42(1): 87-91.

13- Wong A, Chuan SS, Patton WC, Jacobson JD, Corselli J, Chan PJ. Addition of eosin to the aniline blue assay to enhance detection of immature sperm histones. Fertil Steril. 2008; 90(5): 1999-2002.

14- Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol Pathol. 2002; 30(4): 524-33.

15- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxdation. Methods Enzymol. 1978; 52: 302-10.

16- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxdation products; Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol. 1990; 186: 407-21.

17- Pant N, Kumar R, Murthy RC, Srivastava SP. Male reproductive effect of arsenic in mice. Biometals. 2001; 14(2): 113-7.

18- Chattopadhyay S, Ghosh S, Debnath J, Ghosh D. Protection of sodium arsenite-induced ovarian toxicity by coadministration of L-ascorbate (vitamin C) in mature wsistar strain rat. Arch Environ Contam Toxicol. 2001; 41(1): 83-9.

19- Crespy V, Williamson G. A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. J Nutr. 2004; 134(12 Suppl): 3431S-3440S.

20- Chang SI, Jin B, Youn P, Park C, Park JD, Ryu DY. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. Toxicol Appl Pharmacol. 2007; 218(2): 196-203.

21- Das J, Ghosh J, Manna P, Sinha M, Sil PC. Taurine protects rat testes against NaAsO(2)-induced oxidative stress and apoptosis via mitochondrial dependent and independent pathways. Toxicol Lett. 2009; 187(3): 201-10.

22- Agarwal A, Said T. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinicalapproach. BJU Int. 2005; 95(4): 503-7.

23- Abshenas J, Babaei H, Zare MH, Allahbakhshi A, Sharififar F. The effects of green tea (Camellia sinensis) extract on mouse semen quality after scrotal heat stress. Vet Res Forum. 2011; 2(4) 242-7.

24- Venkatesh S, Gurdeep Singh M, Prasad Gupta N, Kumar R, Deecaraman M, Dada R. Correlation of sperm morphology and oxidative stress in infertile men. Iran J Reprod Med. 2009; 7(1): 29-34.

25- Davey JC, Bodwell JE, Gosse JA, Hamilton JW. Arsenic as an endocrine disruptor: effects of arsenic on estrogen receptor-mediated gene expression in vivo and in cell culture. Toxicol Sci. 2007; 98(1): 75-86.

Downloaded from journal.bums.ac.ir at 5:32 IRST on Friday February 23rd 2018

Abstract *Original Article*

Protective role of green tea (*Camellia sinensis*) hydroalcholic extract on sperm parameters and testicular tissue in NMRI mice exposed to sodium arsenite

Seyyed Mohammad Ali Shariatzadeh [1], Maryam Mohammadi[2]

Background and Aim: Sodium arsenite is an environmental pollutant with the capacity of generating free radicals and tissue damage. The aim of the current study was to investigate the effect of green tea extract (GTE), as an antioxidant, on sperm parameters and testis tissues of the mice treated with sodium arsenite.

Materials and Methods: Twenty-four adult male NMRI mice with mean body weight 30±5g were randomly divided into 4 equal groups: control, sodium arsenite (5mg/kg/d.), GTE (100mg/kg/d.) and sodium arsenite+GTE. Oral treatments were performed as long as 34 days. At the end of treatments, body and left testis weight were recorded and the left caudal epididymis of each subject was cut under Ham's F10. Then, the released spermatozoa were used to analyze sperm parameters. Sperm chromatin quality was assessed by nuclear staining using acridine orange and aniline blue. The left testis of each mouse was used for histopathological observation. The serum malondialdehyde (MDA) level was measured as an index of lipid peroxidation. Finally, the obtained data was analyzed by means of one-was ANOVA at the significant level $P<0.05$.

Results: A significant decrease in the number, motility, viability ($P<0.001$) and normal morphology of sperm ($P<0.01$) and also in mean diameter of seminiferous tubules, germinal epithelium thickness ($P<0.001$) were found in the mice treated with sodium arsenite compared to the controls. The mice treated with sodium arsenite revealed a significant increase in the mean diameter of seminiferous tubules lumen and MDA levels ($P<0.001$). The above parameters were significantly compensated in the sodium arsenite+GTE group. Sodium arsenite had no effect on the body and testis weight, diameter of spermatogonial nucleus, sperm DNA integrity, and histone-protamine replacement.

Conclusion: The results indicate that green tea extract can partially be useful in reducing sodium arsenite-induced toxicity.

Key Words: Sodium arsenite; Sperm parameters; Green tea extract; Testis; Mice

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2015; 21 (4): 432-443.

Received: August 19, 2014 ***Accepted: November 30, 2014***

[1] *Ph.D, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran.*
[2] *Corresponding author; MS.c, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran*
mohammadimaryam3286@gmail.com