

بررسی استریولوژیکی اثر حفاظتی عصاره هیدروالکلی چای سبز بر بافت بیضه موش‌های تیمار شده با سدیم ارسنیت

ملک سلیمانی مهرانجانی Ph.D.^{۱*}، محمد حسین شکوهنده M.Sc.^۱

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، اراک، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی تکوینی، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، اراک، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-soleimani@arak.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۲۶

چکیده

هدف: از پژوهش حاضر ارزیابی استریولوژیک از اثر حفاظتی عصاره چای سبز بر تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده در لوله‌های منی‌ساز بیضه رت به‌دنبال تیمار با سدیم ارسنیت می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ۲۴ عدد موش نر بالغ از نژاد NMRI به‌طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند: کنترل، سدیم ارسنیت (mg/kg/day) (۵)، عصاره چای سبز (mg/kg/day) (۱۰۰) و سدیم ارسنیت + عصاره چای سبز. موش‌ها برای ۳۴ روز تحت تیمار دهانی قرار گرفتند. در پایان موش‌ها کشته شده، بیضه راست آن‌ها بیرون آورده، فیکس، پردازش و با روش هایدن هاین آزان رنگ‌آمیزی شد. تغییرات مورفولوژیک بافت بیضه با روش‌های استریولوژی بررسی شد. داده‌ها با کمک آزمون واریانس یک‌طرفه آنالیز و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج: تیمار با سدیم ارسنیت موجب کاهش معنی‌داری در میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز ($P < 0.008$)، ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی ($P < 0.001$) و ضخامت غشای پایه ($P < 0.011$) و همچنین در تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت ($P < 0.003$)، اسپرماتید گرد ($P < 0.028$)، اسپرماتید دراز ($P < 0.011$) و سرتولی ($p < 0.03$) نسبت به گروه کنترل شد. میانگین این تغییرات در گروه چای سبز + سدیم ارسنیت در حد گروه کنترل افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان داد که عصاره چای سبز می‌تواند در کاهش اثرات سمی القا شده توسط سدیم ارسنیت سودمند باشد.

واژگان کلیدی: استریولوژی، بیضه، چای سبز، سدیم ارسنیت، موش

مقدمه

آلودگی شیمیایی و عمل کرد بیضه یک موضوع نگران کننده بزرگی در دهه‌های اخیر بوده است، در سال‌های اخیر این نگرانی در حال فزونی است که بسیاری از مواد شیمیایی ممکن است اثرات زیان باری در سیستم تناسلی مردان داشته باشند. این مواد می‌توانند به عنوان مواد سمی برای بیضه عمل کنند و به ترکیبات گوناگونی مرتبط باشند به طوری که با عادت‌های اجتماعی، شرایط محیط زندگی یا شغلی و یا استفاده از مواد دارویی و مخدر وابسته‌اند (۱).

آرسنیک یک شبه فلز سمی است که به صورت طبیعی در محیط زیست یافت می‌شود و میلیون‌ها نفر در سراسر جهان با آلودگی به این شبه فلز سمی روبرو هستند؛ زیرا که در هوا، آب و خاک یافت می‌شود (۲ و ۳). آلودگی و مسمومیت با آرسنیک پس از آلودگی و مسمومیت با سرب، دومین رتبه را در مسمومیت‌های ناشی از فلزات سنگین دارا می‌باشد (۴).

از دیدگاه بیولوژیکی سمی بودن این عنصر به سه شکل وجود دارد: فرم‌های آرسنیک معدنی، فرم‌های آرسنیک آلی و گاز آرسین (۵). آرسنیک معدنی در حالت‌های گوناگون اکسیداسیون یافت می‌شود که می‌توان به آرسنات و آرسنیت و حالت‌های صفر ظرفیتی آن اشاره کرد (۲). سمیت آرسنیک می‌تواند از یک یا چند مکانیسم سرچشمه بگیرد: تولید گونه‌های اکسیژن واکنش گر (ROS)، مهار سلنوپروتئین‌ها (رفته گر ROS)، پیوستن به گروه تیول پروتئین‌ها و کاهش پیوندهای متیل (۶).

آلودگی دراز مدت به آرسنیک سبب تغییرات پوستی گوناگونی چون افزایش رنگدانه‌های پوستی و کراتوزیس کف دست می‌شود. سرطان ریه، پوست، کبد، کلیه، مثانه، استخوان، روده‌ی بزرگ و معده و همچنین لیمفوما در آلودگی با آرسنیک گزارش شده است (۷). شواهد بسیاری بر نقش استرس اکسیداتیو در نابرابری مردان وجود دارد که به دلیل نقص در تولید و عمل کرد اسپرم می‌باشد (۳). آرسنیک در سیستم تولید مثلی بسیار خطرناک می‌باشد؛ چنانکه در گزارش‌های بسیاری سبب نابرابری در مردان شده است (۴).

چای سبز برگ خشک شده بدون تخمیر گیاه چای (Camellia sinensis) می‌باشد (۸). پلی فنول‌ها بزرگترین گروه از مواد تشکیل دهنده عصاره چای سبز هستند که شامل فلاوانیدول‌ها، فلاونوئیدها و اسیدهای فنولی می‌باشند؛ این ترکیبات می‌تواند تا

۳۰ درصد وزن خشک آن را تشکیل دهند (۹ و ۱۰). فلاونوئیدهای وابسته به کلاس فلاوان ۳ اول‌ها، به نام کاتچین‌ها، بیشترین پلی فنول‌ها در برگ‌های چای می‌باشند که شامل: اپی گالوکاتچین ۳ گالات (EGCG)، اپی گالوکاتچین (EGC)، اپی کاتچین ۳ گالات (ECG) و اپی کاتچین (EC) می‌باشند (۱۱).

چای سبز دارای فعالیت ضد تکثیر برای سلول‌های تومور کبدی (هپاتوما) و همچنین سلول‌های سرطان پستان می‌باشد. چای سبز عاملی برای جلوگیری از استرس اکسیداتیو است. مصرف چای سبز باعث پیشگیری از انواع سرطان چون سرطان ریه، روده‌ی بزرگ، مری، دهان، معده، غده‌ی پانکراس، کلیه و پستان می‌شود. این اثرات به دلیل وجود خاصیت آنتی‌اکسیدانتی بسیار نیرومند پلی فنول‌های چای سبز می‌باشد (۱۰).

هدف از این پژوهش بررسی اثر عصاره چای سبز به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت نیرومند بر بافت بیضه موش‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت، با روش‌های استریولوژیکی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش ۲۴ سر موش نر بالغ از نژاد NMRI (۶۰ روزه) از انیستیتو پاستور ایران خریداری و در خانه حیوانات دانشگاه اراک در شرایط دمایی استاندارد موش (۲۱±۲) درجه سانتی‌گراد و نور محیطی با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و دسترسی آزاد به آب و غذا، نگهداری شدند؛ سپس به طور تصادفی به چهار گروه شش تایی: گروه کنترل؛ گروه تیمار شده با سدیم آرسنیت؛ گروه تیمار شده با عصاره هیدرو الکلی چای سبز؛ گروه تیمار شده با سدیم آرسنیت + عصاره‌ی هیدرو الکلی چای سبز، گروه بندی شدند و پیش از آغاز تیمار موش‌ها وزن شدند.

تیمار به صورت گاوژ دهانی برای ۳۴ روز، یک دوره کامل اسپرما توژنز در موش، انجام گرفت (۱۲). سدیم آرسنیت (تهیه شده از شرکت Merck آلمان) با دوز ۵ mg/kg/day و عصاره‌ی چای سبز که به صورت پودر از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیه شد، با دوز ۱۰۰ mg/kg/day همراه آب مقطر به موش‌ها خوراندند. دوزهای مورد نظر بر پایه پژوهش‌های گذشته انتخاب شدند (۱۳، ۱۴ و ۱۵). به علت روش تیمار دهانی و با توجه به سمیت شدید سدیم آرسنیت و سوزاننده بودن آن، این ماده توسط آب مقطر رقیق شد. از پودر عصاره‌ی چای سبز

(میانگین از هر موش ۱۳۰ تا ۱۵۰ لوله‌ی منی‌ساز) شمارش شدند. چگالی طولی لوله‌های منی‌ساز به‌دست آمد و با ضرب آن در حجم نهایی بیضه طول لوله‌های منی‌ساز به‌دست آمد (۲۰).

برای برآورد میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز با قرار دادن پروب شمارش بر میدان‌های دید انتخاب شده (بزرگنمایی ۱۰۰ برابر) لوله‌های انتخاب شده (میانگین ۱۳۰ تا ۱۵۰ لوله‌ی منی‌ساز) توسط پروب شمارش، به‌وسیله‌ی نرم‌افزار موتیک (2000 Motic image) اندازه‌گیری شدند؛ سپس میانگین آن‌ها برآورد گردید (۲۱).

برای برآورد ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی، میانگین ۵ میدان دید (بزرگنمایی ۱۰۰ برابر) انتخاب شد و با قرار دادن تصادفی پروب سطح بر روی میدان دید، نقاط برخورد کرده به کل بافت و نقاط برخورد کرده به اپی‌تلیوم زایشی شمارش شد و چگالی حجمی اپی‌تلیوم زایشی برآورد گردید. سپس با شمارش نقاط برخورد کرده به سطح اپی‌تلیوم زایشی و تقسیم آن بر نقاط برخورد کرده به بافت اپی‌تلیوم زایشی چگالی سطحی آن برآورد و با تقسیم چگالی حجمی بر چگالی سطحی اپی‌تلیوم ارتفاع آن به‌دست آمد (۲۲).

برای برآورد ضخامت غشای پایه به‌طور میانگین ۲۴ تا ۲۶ میدان دید از برش‌های ۵ میکرونی (بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر)، انتخاب و با قرار دادن پروب دارای خطوط ایزوتروپیک از محل برخورد خطوط با بخش درونی غشای پایه، خط مستقیم و عمود بر سطح خارجی غشا (میانگین ۱۳۰ تا ۱۵۰ نقطه از غشا) با نرم افزار موتیک اندازه‌گیری شد. سپس با روش هارمونیک میانگین آن‌ها به‌دست آمد (۲۳).

برای برآورد شمار سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید (گرد و دراز) و سلول‌های سرتولی از روش Optical dissector و از قالب مخصوص شمارش یا unbiased counting frame استفاده شد. قالب شمارش به‌طور تصادفی بر میدان‌های دید انتخاب شده از برش‌های ۲۰ میکرونی (بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر)، قرار داده شد، از هر طرف (بالا و پایین) تا عمق ۵ میکرون بخش‌های دارای آرتی‌فکت در نظر گرفته شد و در آن بخش‌ها شمارش انجام نگرفت. سلول‌های انتخاب شده توسط قالب در عمق‌های دیگر شمارش شدند (میانگین ۱۳۰ تا ۱۵۰ عدد از هر سلول). عمق‌های مورد نظر با دستگاه میکروکیتور مدل (HEIDEN HAIN (ND 221 B) ساخت

نیز به‌وسیله آب مقطر غلظت مورد نظر از عصاره برحسب میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان تهیه شد. برای گروه کنترل نیز گاوآذ دهانی انجام گرفت تا آنکه گروه‌های موش در استرس ناشی از گاوآذ با هم یکسان باشند.

پس از پایان تیمار نیز، نخست موش‌ها وزن شدند و سپس توسط دی اتیل اتر بی‌هوش گردیدند. پس از آن بیضه برداشته و وزن شده و سپس حجم آن به‌روش شناورسازی (Immersion) اندازه‌گیری شد (۱۶). پس از شستشوی بافت بیضه در نرمال سالین، با فیکساتیو تازه تهیه شده (Modified MDF (Davidson's Fluid) برای ۷ روز فیکس گردید که در طی این مدت یک‌بار فیکساتیو تعویض گردید (۱۷ و ۱۸). سپس از روش Orientator برای به‌دست آوردن برش‌های (Isotropic uniform Random) از بیضه استفاده شد (۱۹). پس از آن با دستگاه پاساژ، پاساژ بافتی انجام گرفت و سپس برش‌ها در بلوک پارافینی گمارده شدند و توسط دستگاه میکروتوم برش‌های ۵ و ۲۰ میکرونی از آن‌ها تهیه شد که با روش Heidenhain's Azan رنگ‌آمیزی شدند.

برای برآورد میزان چروکیدگی بافتی دو تا سه قطعه گرد با تروکار از برش‌های بیضه هر موش پیش از پاساژ بافتی تهیه شد و با دستگاه کولیس‌ورنیه شعاع آن‌ها اندازه‌گیری شد. پس از پاساژ و رنگ‌آمیزی نیز شعاع آن‌ها دوباره اندازه‌گیری شد و بدین ترتیب میزان چروکیدگی بافتی به‌دست آمد. حجم بیضه در میزان چروکیدگی ضرب گردید و بدین ترتیب حجم نهایی بیضه (حجم بیضه پس از انجام مراحل پاساژ و بلوک‌گیری و رنگ‌آمیزی) به‌دست آمد (۲۰).

برای برآورد حجم لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی از هر برش ۵ میکرونی میانگین ۵ میدان دید با میکروسکوپ Olympus DP12 (بزرگنمایی ۱۰۰ برابر)، انتخاب شد و با قرار دادن تصادفی پروب نقطه بر روی میدان دید نقاط برخورد کرده به کل بافت و نقاط برخورد کرده به لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی شمارش شد و بدین ترتیب چگالی حجمی هر یک برآورد شد. سپس با ضرب چگالی حجمی هر یک بر حجم نهایی بیضه حجم هر یک به‌دست آمد (۱۹).

برای برآورد طول لوله‌های منی‌ساز نیز حدود ۵ میدان دید از هر برش ۵ میکرونی (بزرگنمایی ۱۰۰ برابر) انتخاب و با قرار دادن پروب شمارش بر روی آن، پروب‌هایی به‌طور تصادفی انتخاب

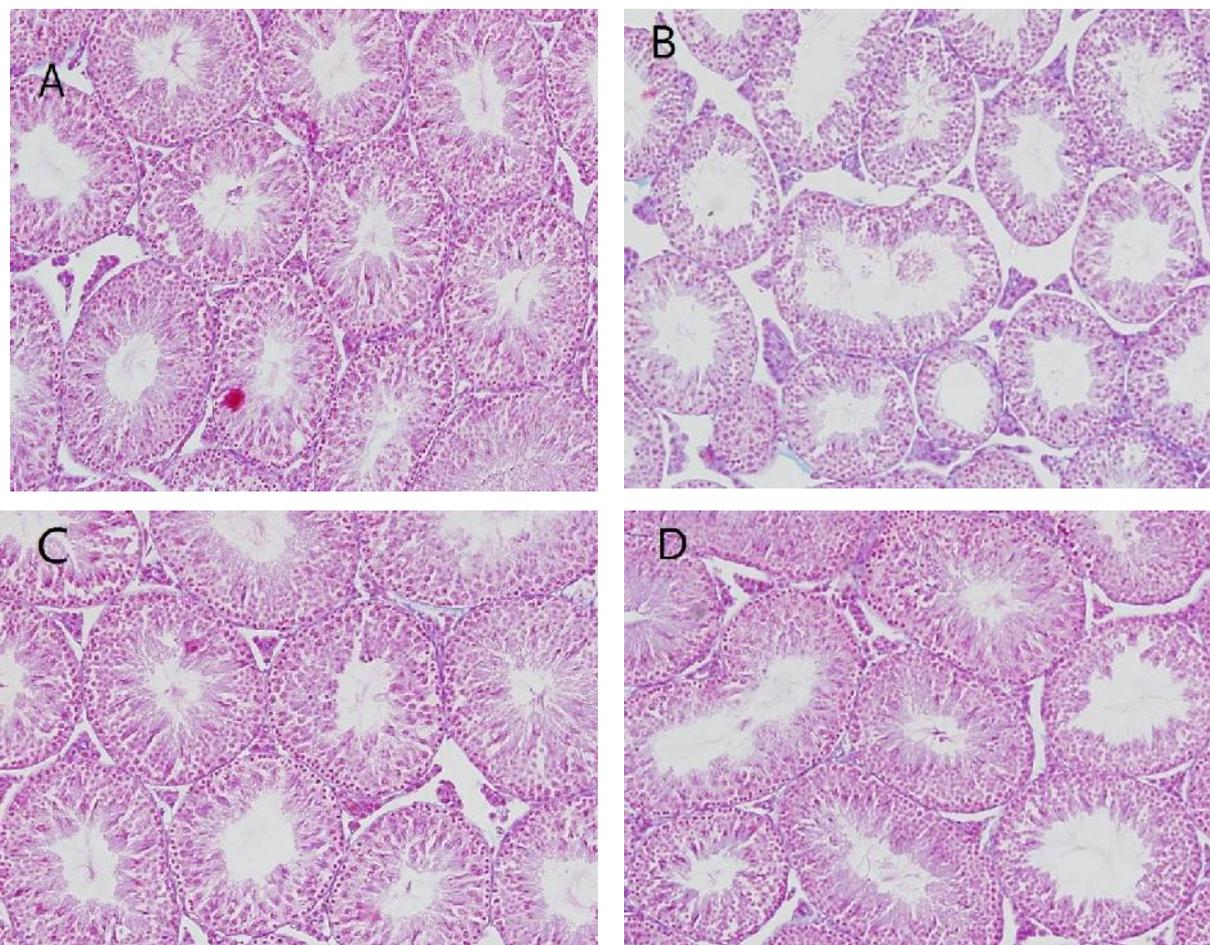
موش‌های گروه سدیم ارسنیت آتروفی لوله‌های منی‌ساز و ادم بافتی و کاهش ارتفاع اپی‌تلیوم به آسانی دیده می‌شود و پیوستگی آن تا اندازه‌ای از دست رفته است و در برخی قسمت‌ها واکوئله‌زایی دیده می‌شود (شکل B-1). در بیضه‌ی موش‌های گروه عصاره‌ی چای سبز لوله‌های منی‌ساز ساختاری طبیعی همچون گروه کنترل دارند (شکل C-1). در گروه سدیم ارسنیت+عصاره‌ی چای سبز تا اندازه‌ی زیادی از تخریب‌ها و تغییرات بافتی که در گروه سدیم ارسنیت دیده شد، جلوگیری کرده است و نمای بافتی به میزان زیادی همانند گروه کنترل است (شکل D-1).

آلمان به دست آمد. سپس چگالی عددی سلول‌ها به دست آمد و در حجم نهایی بیضه ضرب شد و بدین‌گونه شمار سلول‌ها تخمین زده شد. (۲۴).

داده‌های به دست آمده در نرم‌افزار Spss مدل ۱۸ و روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) و تست آماری Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت، تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

در بیضه موش‌های گروه کنترل لوله‌های منی‌ساز و اپی‌تلیوم زایشی حالت طبیعی خود را داشتند (شکل A-1). در بیضه



شکل ۱: تصویرهای میکروسکوپی از بافت بیضه موش‌های بالغ در گروه‌های مختلف (برش‌های ۵ میکرونی، با رنگ آمیزی هایدن-هاین-آزان، بزرگنمایی $\times 200$): (A) آرایش طبیعی اپی‌تلیوم زایشی در گروه کنترل. (B) آرایش غیر طبیعی اپی‌تلیوم زایشی و کاهش ارتفاع آن همراه با واکوئله شدن و کاهش اسپرمتوژنز در گروه تیمار شده با سدیم ارسنیت. (C) آرایش طبیعی اپی‌تلیوم زایشی در گروه تیمار شده با عصاره چای سبز. (D) آرایش طبیعی اپی‌تلیوم زایشی همانند گروه کنترل در گروه تیمار شده با سدیم ارسنیت به‌همراه عصاره چای سبز.

۲) در گروه‌های مختلف موش نسبت به هم اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P > 0.05$).

در گروه سدیم ارسنیت کاهش معنی‌داری نسبت به دیگر گروه‌ها در قطر لوله‌های منی‌ساز ($P < 0.008$) و ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی ($P < 0.0009$) دیده شد، که عصاره چای سبز توانست از این کاهش در گروه سدیم ارسنیت+ عصاره چای سبز، جلوگیری کند. همچنین ضخامت غشای پایه در گروه سدیم ارسنیت نسبت به گروه کنترل و گروه عصاره چای سبز تفاوت معنی‌داری ($P < 0.011$) داشت، گرچه ضخامت غشای پایه در گروه سدیم ارسنیت + عصاره چای سبز تفاوت معنی‌داری را با گروه سدیم ارسنیت نشان نداد ولی این پارامتر در این گروه تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نیز نداشت ($P > 0.05$) (جدول ۲).

میانگین وزن موش‌ها پس از تیمار، در گروه‌های سدیم ارسنیت، چای سبز و سدیم ارسنیت+ عصاره چای سبز نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$)، همچنین میان این سه گروه نیز تفاوت معنی‌داری دیده نشد ($P > 0.05$). در مورد میانگین وزن و حجم بیضه، میان گروه‌های مذکور با گروه کنترل و میان خود آن گروه‌ها، اختلاف معنی‌داری دیده نشد ($P > 0.05$) (جدول ۱).

میانگین حجم لوله‌های منی‌ساز در گروه سدیم ارسنیت نسبت به گروه کنترل و سدیم ارسنیت+ عصاره چای سبز تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P > 0.05$) ولی نسبت به گروه عصاره چای سبز کاهش معنی‌داری ($P < 0.031$) را نشان داد (جدول ۱). حجم بافت بینابینی (جدول ۱) و طول لوله‌های منی‌ساز (جدول

جدول ۱: مقایسه میانگین وزن بدن، وزن، حجم بیضه و حجم لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی در گروه‌های مختلف موش پس از ۳۴ روز تیمار با سدیم ارسنیت ($\Delta mg/kg/day$) و عصاره چای سبز ($100 mg/kg/day$). مقادیر به صورت $means \pm SD$ می‌باشد. میانگین‌ها با کدهای مختلف دارای تفاوت معنی‌داری نسبت به یکدیگر می‌باشند ($P < 0.05$ و *One way ANOVA, Tukey's test*).

گروه‌ها	وزن بدن قبل از تیمار (gr)	وزن بدن در پایان دوره تیمار (gr)	وزن بیضه (mg)	حجم بیضه (mm^3)	حجم لوله های منی ساز (mm^3)	حجم بافت بینابینی (mm^3)
کنترل	$34/75 \pm 2/50a$	$35/95 \pm 3/64a$	$120 \pm 20a$	$94/04 \pm 8/69a$	$79/56 \pm 7/66ab$	$14/48 \pm 1/39a$
سدیم ارسنیت	$33/24 \pm 2/93a$	$34/55 \pm 2/40a$	$120 \pm 20a$	$86/53 \pm 5/41a$	$69/95 \pm 4/69b$	$16/58 \pm 2/07a$
چای سبز	$34/45 \pm 1/26a$	$36/72 \pm 1/72a$	$120 \pm 30a$	$100/06 \pm 13/22a$	$84/34 \pm 11/97a$	$15/66 \pm 1/47a$
سدیم ارسنیت + چای سبز	$34/18 \pm 1/79a$	$34/63 \pm 3/36a$	$120 \pm 20a$	$89/66 \pm 5/99a$	$75/4 \pm 6/8ab$	$14/26 \pm 1/59a$

جدول ۲: مقایسه میانگین طول، قطر، ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی و ضخامت غشای پایه لوله‌های منی‌ساز در گروه‌های مختلف موش پس از ۳۴ روز تیمار با سدیم ارسنیت ($\Delta mg/kg/day$) و عصاره چای سبز ($100 mg/kg/day$). مقادیر به صورت $means \pm SD$ می‌باشد. میانگین‌ها با کدهای مختلف دارای تفاوت معنی‌داری نسبت به یکدیگر می‌باشند ($P < 0.05$ و *One way ANOVA, Tukey's test*).

گروه‌ها	طول لوله‌های منی ساز (m)	قطر لوله‌های منی ساز (μm)	ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی (μm)	ضخامت غشا پایه (μm)
کنترل	$2/33 \pm 0/21a$	$190/37 \pm 6/58a$	$53/97 \pm 1/91a$	$4/85 \pm 0/21a$
سدیم ارسنیت	$2/04 \pm 0/37a$	$165/75 \pm 17/16b$	$39/51 \pm 4/39b$	$4/39 \pm 0/3b$
چای سبز	$2/4 \pm 0/58a$	$186/38 \pm 9/16a$	$58/4 \pm 4/79a$	$4/88 \pm 0/16a$
سدیم ارسنیت + چای سبز	$2/28 \pm 0/21a$	$185/34 \pm 10/87a$	$54/6 \pm 4/70a$	$4/74 \pm 0/21ab$

میانگین شمار سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه سدیم ارسنیت نسبت به گروه عصاره چای سبز کاهش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.001$) ولی نسبت به گروه کنترل و عصاره چای سبز + سدیم ارسنیت تفاوت معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$) (جدول ۳). همچنین گروه سدیم ارسنیت کاهش معنی‌داری را در شمار سلول‌های اسپرماتوسیت ($p < 0.003$)، اسپرماتید گرد

جدول ۳: مقایسه میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید گرد، اسپرماتید دراز و سرتولی ($\times 10^6$) در گروه‌های مختلف موش پس از ۳۴ روز تیمار با سدیم ارسنیت (5 mg/kg/day) و عصاره چای سبز (100 mg/kg/day). مقادیر به صورت $means \pm SD$ می‌باشد. میانگین‌ها با کدهای گوناگون دارای تفاوت معنی‌داری نسبت به یکدیگر می‌باشند ($P < 0.05$ و $One\ way\ ANOVA, Tukey's\ test$).

گروه‌ها	تعداد سلول‌های سرتولی $\times 10^6$	تعداد سلول‌های اسپرماتید دراز $\times 10^6$	تعداد سلول‌های اسپرماتید گرد $\times 10^6$	تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت $\times 10^6$	تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی $\times 10^6$
کنترل	$2/46 \pm 0/33a$	$43/03 \pm 4/68a$	$42/62 \pm 7/13a$	$22/88 \pm 2/43a$	$6/47 \pm 0/88ab$
سدیم ارسنیت	$2/98 \pm 0/48b$	$29/8 \pm 7/80b$	$34/13 \pm 5/04b$	$16/9 \pm 2/41b$	$5/53 \pm 0/93b$
چای سبز	$3/33 \pm 0/25a$	$41/56 \pm 7/88a$	$44/27 \pm 5/4a$	$23/82 \pm 2/94a$	$6/86 \pm 0/37a$
سدیم ارسنیت + چای سبز	$3/27 \pm 0/23a$	$40/81 \pm 5/9a$	$40/52 \pm 4/13a$	$21/25 \pm 2/48a$	$5/99 \pm 0/49ab$

بحث

است که می‌تواند از فعالیت پروستاگلاندین و نوعی ادم بافتی بر اثر تیمار با سدیم ارسنیت باشد (۲۶).

میانگین طول لوله‌های منی‌ساز در هیچ کدام از گروه‌ها تفاوت معنی‌داری را نداشت. طول لوله‌ها به سه شاخص بستگی دارد: حجم بیضه، قطر لوله‌ها و حجم لوله‌ها (۲۷). از آنجا که در آزمایش ما حجم بیضه و حجم لوله‌های منی‌ساز تغییری نداشت و تنها قطر لوله‌ها کاهش داشت، تغییرات در آن اندازه‌ای نبوده است که سبب تغییر در طول لوله‌ها شود. ضخامت غشای پایه لوله‌های منی‌ساز در گروه سدیم ارسنیت کاهش معنی‌داری با گروه کنترل داشت؛ همچنین در برخی از آزمایش‌های دیگر کاهش ضخامت غشای پایه گزارش شده است (۲۸).

کاهش سلول‌های سرتولی و همچنین سلول‌های اسپرماتوسیت و اسپرماتید گرد و دراز که در حقیقت همان کاهش اسپرماتوژن است، در گروه سدیم ارسنیت در آزمایش‌های گوناگونی گزارش شده است (۲۹).

قطر لوله‌های منی‌ساز و ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی در گروه سدیم ارسنیت کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشتند که این کاهش در گروه عصاره چای سبز + سدیم ارسنیت تا اندازه‌ی گروه کنترل جبران شد. کاهش قطر لوله‌های منی‌ساز می‌تواند از کاهش ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی باشد و کاهش ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی می‌تواند از کاهش اسپرماتوژن و سلول‌های اپی‌تلیوم زایشی باشد. در پژوهش‌های دیگر نیز چای سبز توانسته است از بسیاری از آثار مورفولوژیکی زیان‌بار مواد سمی چون کادمیوم کلراید، سرب و داروی دوکسوروبیسین جلوگیری کند (۲۵).

حجم بافت بینابینی در گروه سدیم ارسنیت نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ولی نسبت به گروه عصاره چای سبز کاهش معنی‌داری دارد که این کاهش در گروه سدیم ارسنیت + عصاره چای سبز تا حد گروه کنترل جبران شده است. این کاهش در برخی از آزمایش‌های دیگر دیده شده

پروتئین سیکلین ۱ می‌شود که این پروتئین یکی از فاکتورهای لازم برای میتوز می‌باشد (۳۹).

عصاره چای سبز توانست از کاهش سلول‌های اپی‌تلیوم زایشی توسط سدیم ارسنیت در گروه عصاره چای سبز + سدیم ارسنیت جلوگیری کند و آن‌ها را در حد گروه کنترل نگه دارد. در پژوهش‌های دیگری نیز چای سبز توانسته است از کاهش سلول‌های اپی‌تلیوم و اسپرماتوژنز توسط مواد سمی چون سرب و داروی دوکسوروبیسیسین جلوگیری کند (۲۵ و ۴۰). این جلوگیری می‌تواند به سبب ویژگی آنتی‌اکسیدانتی نیرومند چای سبز باشد که به دلیل دارا بودن درصد بالایی از پلی‌فنول‌ها، باعث مهار رادیکال‌های آزاد می‌شود (۴۱).

پلی‌فنول‌های چای سبز نه تنها فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانتی را نشان می‌دهند، همچنین توانایی القای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی چون گلوکوتایون پروکسیداز، گلوکوتایون ردوکتاز، کاتالاز، کوئینون ردوکتاز و سوپراکسید دیسموتاز را در بافت‌های گوناگون از خود نشان می‌دهند (۴۲). از این رو چای سبز می‌تواند با فعال کردن این آنزیم‌ها سبب کاهش بار اکسیداتیو و جلوگیری از آسیب‌های آن به سلول‌های اپی‌تلیوم زایشی بیضه شود.

عدم کاهش وزن بدن توسط سدیم ارسنیت در پژوهش ما می‌تواند به سبب دوز پایین‌تر یا تیمار دهانی سدیم ارسنیت باشد که سبب متابولیزه شدن ارسنیت و کاهش سمیت آن می‌شود و یا به علت تیمار در زمان بلوغ باشد چرا که آزمایش‌هایی که با تیمار درون صفاقی و یا دوز بالاتر و مدت طولانی‌تر و یا در سن رشد انجام گرفته است کاهش وزن بدن را گزارش کرده‌اند (۴۳ و ۴۴).

همچنین عدم کاهش وزن و حجم بیضه و حجم لوله‌های منی‌ساز توسط سدیم ارسنیت در پژوهش ما می‌تواند از دوز پایین و یا تیمار دهانی و یا تیمار در سن بلوغ باشد به سبب آنکه رشد بیضه و لوله‌های منی‌ساز کامل شده بود. در حالی که در پژوهش‌هایی که تیمار در سن رشد انجام گرفته و یا با تزریق درون صفاقی و یا با دوز بالاتر یا مدت بیشتر، کاهش وزن بیضه گزارش شده است (۲۸ و ۴۳).

نتیجه گیری

چنانچه مشاهده شد، سدیم ارسنیت به‌عنوان یک ماده آلاینده سمی با دوز ۵ mg/kg/day باعث بروز آثار مخرب پاتولوژیکی

سدیم ارسنیت می‌تواند به چندین علت باعث کاهش سلول‌های اپی‌تلیوم زایشی به‌ویژه سلول‌های اسپرماتوژنیک شود: کاهش سطح تستوسترون که باعث کاهش اسپرماتوژنز و جداسدن سلول‌های اسپرماتوژنیک از سلول‌های سرتولی و سرانجام مرگ آن‌ها می‌شود و این خود می‌تواند از کاهش هورمون لوتئیزه کننده *LH (Luteinising Hormon)* بر اثر ارسنیک باشد و یا اثر سمی ارسنیک بر سلول‌های لیدیک، تولیدکننده‌های تستوسترون و ایجاد آپوپتوزیس در آن‌ها باشد (۳۰). کاهش بیان پروتئین پیوند شونده به آندروژن (*Androgen Binding Protein (ABP)*) که برای بقای اسپرماتوژنز بایسته است و این کاهش می‌تواند از کاهش هورمون محرک فولیکول (*Follicle-Stimulating Hormon (FSH)*) توسط سدیم ارسنیت باشد (۳۱ و ۳۲). همچنین سدیم ارسنیت باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی چون سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوکوتایون ردوکتاز و گلوکوتایون پروکسیداز می‌شود و در نتیجه باعث افزایش فعالیت اکسیداسیون و رادیکال‌های آزاد می‌شود (۳۳ و ۳۴). سدیم ارسنیت با کاهش بیان پروتئین کانکسین ۴، باعث آسیب به پیوندهای شکافدار شده که این پیوندها در میان سلول‌های اسپرماتوژنیک و سلول‌های سرتولی می‌باشند و راه عبور مواد غذایی از سلول‌های سرتولی به سلول‌های اسپرماتوژنیک هستند (۳۵). سدیم ارسنیت با تولید رادیکال‌های آزاد می‌تواند سبب افزایش آپوپتوزیس سلول‌های اپی‌تلیوم زایشی شود (۳۶).

سلول‌های اسپرماتوگونی در پژوهش ما در گروه سدیم ارسنیت تغییر معنی‌داری با گروه کنترل نداشتند. در پژوهش‌های گوناگون آشکار شده که سلول‌های اسپرماتوگونی طی فرآیند میتوز و تقسیم سلولی حساسیت بیشتری به سم سدیم ارسنیت دارد (۳۷). همان‌گونه که *Aydos* و همکاران (۳۸) گزارش کردند سلول‌های اسپرماتوگونی مقاوم‌ترین سلول‌های اسپرماتوژنیک به برخی سموم می‌باشند. این عدم تغییر در سلول‌های اسپرماتوگونی در آزمایش ما آشکار می‌سازد که این سلول‌ها پایداری بیشتری به سمیت سدیم ارسنیت از خود نشان می‌دهند.

سدیم ارسنیت به دلیل ایجاد استرس اکسیداتیو و تولید رادیکال‌های آزاد می‌تواند باعث توقف اسپرماتوگونی‌های نوع *B* در مرحله *GI* میتوز شود؛ زیرا فرآورده ژن *XPBI* که پروموتور آن توسط استرس اکسیداتیو فعال می‌شود، باعث مهار بیان

12. Gilbert, S.F. 8th Ed. Developmental Biology. Stamford: Sinauer associates; 2006.

13. 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. *J Reprod biol endocrinol*. 2006; 16: 4-9.

14. Patil L, Balaraman R. Green tea extract protects doxorubicin induced testicular damages in rats. *J Pharmacologyonline*. 2008; 1(3): 913-925.

15. 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.

16. Mandarim DL. Stereological tools in biomedical research. *J An Acad Bras Cienc*. 2003; 75(4): 469-486.

17. Latendresse JR, Warbritton 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. *J Toxicol Pathol*. 2002; 30(4): 524-33.

18. Howroyd P, Thacker RH, Lyght O, Williams D, et al. Morphology of the fetal rat testis preserved in different fixatives. *J Toxicol pathol*. 2005; 33(2): 300-304.

19. Howard C, Reed M. Unbiased Stereology: Three Dimensional Measurement in Microscopy. *J Anat*. 1999; 194: 153-157.

20. Hoseini L, Roozbeh J, Sagheb M, Doust SK, et al. Nandrolonedecanoate increases the volume but not the length of the proximal and distal convoluted tubules of the mouse kidney. *J Micron*. 2009; 40(2): 226-230.

21. Dalgaard M, Pilegaard K, Ladefoged O. In utero exposure to diethylstilboestrol or 4-nonylphenol in rats: number of sertoli cells, diameter and length of seminiferous tubules estimated by stereological methods. *J Pharmacol Toxicol*. 2002; 90(2): 59-65.

22. Soleimani MM, Noorafshan A, Momeni HR, Abnosi MH, et al. Stereological study of the effects of vitamin E on testis structure in rats treated with paranonylphenol. *Asian J Androl*. 2009; 11(4): 508-516.

23. Nyengaard JR, Ferrando RE, Hays SR, Fahy SV, et al. Applying stereology to measure thickness of the basement membrane zone in bronchial biopsy specimens. *J Allergy clinImmunol*. 2003; 112(6): 1243-5.

24. Peng B, Zhang RD, Dai XZ, Deng XZ, et al. Quantitative (stereological) study of the effects of

چون واکوتله‌زایی در اپی‌تلیوم زایشی بیضه و کاهش ارتفاع اپی‌تلیوم و قطر لوله‌های منی‌ساز و کاهش اسپرماتوژنز و سلول‌های سرتولی در بیضه شد که عصاره چای سبز با دوز 100 mg/kg/day به‌عنوان یک داروی آنتی‌اکسیدانت توانست تا اندازه‌ی بسیاری از این آثار مخرب جلوگیری کند. بنابراین چای سبز به‌عنوان یک مکمل غذایی برای کسانی که در معرض آلودگی شغلی یا محیطی با این عنصر هستند، توصیه می‌شود.

منابع

1. Obregón EB, Hartley R. Ecotoxicology and Testicular Damage (Environmental Chemical Pollution). A Review. *J Morphol*. 2008; 26(4): 833-840.
2. Cutter GA. Kinetic controls on metalloid speciation in sea water. *J Marine Chem*. 1992; 40(1-2): 65-80.
3. Obregón EB, Poblete D, Catriao R, Fernandes FH. Protective Role of Melatonin in Mouse Spermatogenesis Induced by Sodium Arsenite. *J Morphol*. 2013; 31(3): 849-856.
4. Sudha K. Effect of arsenic induced toxicity in testis of male rats. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*. 2012; 2(3): 126-130.
5. Sabina, C.G, Kunibert, H, Hans, U.W. 1th Ed. Arsenic and Arsenic Compounds. Weinheim: Wiley-VCH; 2008.
6. Huang H, Ke Q, Costa M, Shi X. Molecular mechanisms of arsenic carcinogenesis. *J Mol Cell Biochem*. 2004; 255(1-2): 57-66.
7. Ratnaike RN. Acute and chronic arsenic toxicity. *J Postgrad Med*. 2003; 79(933): 391-396.
8. Namita P, Mukesh R, Vijay KJ. Camellia Sinensis (Green Tea): A Review. *Global Journal of Pharmacology*. 2012; 6(2): 52-59.
9. Chen D, Dou QP. Tea polyphenols and their roles in cancer prevention and chemotherapy. *International journal of molecular sciences*. 2008; 9(7): 1196-1206.
10. Chacko SM, Thambi PT, Kuttan R, Nishigaki I. Beneficial effects of green tea: A literature review. *J Chinese Medicine*. 2010; 5(13): 1-9.
11. Chen D, Wan SB, Yang H, Yuan J, et al. EGCG, Green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer. *J Author manuscript*. 2011; 53: 155-177.

- vasectomy on spermatogenesis in rhesus monkeys (Macacaculatta). *J Reproduction*. 2002; 124(6): 847-56.
25. Tarek ME, Mehana SE, Meki ARM. Histological and biochemical changes in the testis of rats exposed to lead: protective effect of green tea extract. *Al-Azhar Assiut Medical Journal*. 2009; 7:1687-1693.
26. Raleigh D, O'Donnell L, Southwick GJ, Kretser DD, et al. Stereological analysis of the human testis after vasectomy indicates impairment of spermatogenic efficiency with increasing obstructive interval. *Fertil Steril*. 2004; 81(6): 1595-1603.
27. Franca LR, Russell LD. *The testes of domestic animals*. 1th ed. Madrid: Regadera martinez-garcia; 1998.
28. Imran A, Tassaduq H, Khalid MA. Arsenic induced microscopic changes in rat testis. *J Professional med*. 2008; 15(2): 287-291.
29. Reddy PS, Rani GP, Sainath SB, Meena R, et al. Protective effects of N-acetylcysteine against arsenic-induced oxidative stress and reprotoxicity in male mice. *J Trace Elem Med Biol*. 2011; 25(4): 247-253.
30. Sanghamitra S, Hazra J, Upadheyay SN, Singh KR, et al. Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2008; 52(1): 84-90.
31. Rosenblatt AE, Burnstein KL. Inhibition of androgen receptor transcriptional activity as a novel mechanism of action of arsenic. *J Mol Endocrinol*. 2009; 23(3): 412-21.
32. Chattopadhyay S, Ghosh S, Chaki S, Debnath J, et al. Effect of sodium arsenite on plasma levels of gonadotrophins and ovarian steroidogenesis in mature albino rats duration-dependent response. *J Toxicol Sci*. 1999; 24(5): 425-31.
33. Morakinyo AO, Achema PU, Adegoke OA. Effect of Zingiber Officinale (Ginger) on Sodium Arsenite-Induced Reproductive Toxicity in Male Rats. *J Biomed*. 2010; 13: 39 - 45.
34. Chandranayagam C, Veeraraghavan G, Subash A, Vasanthi HR. Restoration of arsenite induced hepato-toxicity by crude tannin rich fraction of Theobroma cacao in Sprague Dawley rats. *J Food Research International*. 2013; 50(1): 46-54.
35. Li L, Han ZY, Li CM, Jiang XQ, et al. Upregulation of heat shock protein 32 in Sertoli cells alleviates the impairments caused by heat shock-induced apoptosis in mouse testis. *J Cell Stress Chaperones*. 2013; 18(3): 333-351.
36. Rodríguez VM, Carrizales L, Mendoza MS, Fajardo OR, et al. Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat. *J Neurotoxicol Teratol*. 2002; 24(6): 743-50.
37. Omura M, Yamazaki K, Tanaka A, Hirata M, et al. Changes in the Testicular Damage Caused by Indium Arsenide and Indium Phosphide in Hamsters during Two Years after Intratracheal Instillations. *J Occup Health*. 2000; 42(4): 196-204.
38. Aydos K, Guven MC, Can B, Ergun A. Nicotine toxicity to the ultrastructure of the testis in rats. *BJU International*. 2001; 88(6): 622-626.
39. Jedlinska-Krakowska M, Bomba G, Jakubowski G, Rotkiewicz T, et al. Impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testes morphology in rats. *J Reprod Dev*. 2006; 52(2): 203-209.
40. Sato K, Sueoka K, Tanigaki R, Tajima H, et al. Green tea extracts attenuate doxorubicin-induced spermatogenic disorders in conjunction with higher telomerase activity in mice. *J Assist reprod genet*. 2010; 27(8): 501-508.
- 41- Chen L, Zhang HY. Cancer Preventive Mechanisms of the Green Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-gallate. *J Molecules*. 2007; 12(5): 946-957.
- 42- Shukla Y. Tea and Cancer Chemoprevention: A Comprehensive Review. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2007; 8(2): 155-166.
- 43- Kaushal P, Dhar P, Shivaprasad SM, Mehra RD. Postnatal Exposure to Sodium Arsenite (NaAsO₂) Induces Long Lasting Effects in Rat Testes. *J Toxicol Int*. 2012; 19(2): 215-222.
- 44- Adil M, Visnagri A, Shiva Kumar V, Kandhare A, et al. Protective Effect of Naringin on Sodium Arsenite Induced Testicular Toxicity via Modulation of Biochemical Perturbations in Experimental Rats. *J Pharmacologia*. 2014; 5(6): 222-234.

Stereological study of the protective effect of green tea extract on the testicular tissue of mice treated with sodium arsenite

Soleimani Mehrnjani M, Ph.D. *, Mohammad Hosein Shokuhande MH, M.Sc.

-Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

* Email corresponding author: m-soleimani@arak.ac.ir

Received: 17 Dec. 2014

Accepted: 10 Mar. 2015

Abstract

Aim: The aim of the present study was to stereological evaluate the protective effect of green tea extract on the morphological changes of seminiferous tubules following sodium arsenite exposure in mice.

Material and Methods: 24 adult male NMRI mice were randomly divided into four groups including control, sodium arsenite (5mg/kg/day), green tea extract (100 mg/kg/day) and finally sodium arsenite+green tea extract. Mice were (orally) treated for 34 days. At the end, mice were sacrificed and their right testis were taken out, fixed, processed and stained with heidenhain' azan method. The morphological and changes of testicular tissue was examined using stereological methods. Data were analyzed using one way ANOVA and means difference was considered significant at $P<0.05$.

Results: Sodium arsenite treatment caused a significant decrease in the mean seminiferous tubules diameter ($p<0.008$), germinal epithelium height ($p<0.001$) and the basement membrane thickness ($p<0.011$) as well as in the number of spermatocyte ($p<0.003$), round spermatid ($p<0.028$), long spermatid ($p<0.011$) and sertoli ($p<0.03$) cells compared to the control group. The above changes increased to the control level in sodium arsenite+green tea extract group.

Conclusions: The results indicate that green tea extract may be useful in reducing the toxic effects induced by sodium arsenite.

Keywords: Green tea, Mice, Sodium arsenite, Stereology, Testes