

## نقش حفاظتی عصاره هیدروالکلی چای سبز (*Camellia sinensis*)

### بر پارامترهای اسپرم و بافت بیضه در موش‌های نژاد NMRI

### در معرض سدیم آرسنیت

سید محمدعلی شریعت‌زاده<sup>1</sup>، مریم محمدی<sup>2</sup>

#### چکیده

زمینه و هدف: سدیم آرسنیت، 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 تیمار شده با سدیم آرسنیت بود. روش تحقیق: در این مطالعه تجربی، موش‌های نر بالغ نژاد NMRI، به‌طور تصادفی، در 4 گروه (n=6) شامل گروه‌های: کنترل، دریافت‌کننده سدیم آرسنیت (5 mg/kg/day)، دریافت‌کننده GTE (100mg/kg/day) و گروه دریافت‌کننده سدیم آرسنیت + GTE قرار گرفتند و به‌مدت 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. کیفیت 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، تحرک، قابلیت حیات ( $P<0/001$ ) و مورفولوژی طبیعی اسپرم ( $P<0/01$ ) و همچنین کاهش معنی‌داری در قطر لوله‌های منی‌ساز و ضخامت اپیتلیوم زایشی ( $P<0/001$ ) در موش‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید. موش‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت، افزایش معنی‌داری در قطر لومن لوله‌های منی‌ساز و سطح MDA ( $P<0/001$ ) نشان دادند. پارامترهای فوق در گروه دریافت‌کننده سدیم آرسنیت + GTE به‌طور معنی‌داری جبران شد. سدیم آرسنیت، تأثیری بر وزن بدن و بیضه، قطر هسته اسپرماتوگونی، کیفیت DNA اسپرم و جایگزینی پروتئین به‌جای هیستون نداشت. نتیجه‌گیری: عصاره الکی چای سبز (GTE)، احتمالاً می‌تواند تا حدودی در کاهش سمیت ناشی از سدیم آرسنیت مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: بیضه؛ پارامترهای اسپرم؛ سدیم آرسنیت؛ 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

<sup>1</sup> استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران؛

<sup>2</sup> نویسنده مسؤل؛ کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی تکوینی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران؛

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

تلفن: 08643254128 شماره: 0863-4173409 پست الکترونیک: MohammadiMaryam3286@gmail.com

## 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 به دلیل تقسیم سریع سلول‌های اسپرماتوگونی، نسبت به بسیاری از مواد 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 به وسیله 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 (پنج ظرفیتی) و آرسنیت (سه ظرفیتی) یافت می‌شود. گزارش شده است که سمیت ترکیبات آرسنیت بالاتر از آرسنات است؛ علاوه بر این، آرسنیک در ساخت علف‌کش‌ها، حشره‌کش‌ها، مواد کشنده جوندگان، مواد نگهدارنده مواد غذایی و حتی داروها کاربرد دارد؛ از طرفی آرسنیک به عنوان یک ماده 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، سدیم آرسنیت می‌باشد که ماده‌ای بی‌بو و بی‌رنگ است. سدیم آرسنیت، یک آلاینده زیست‌محیطی می‌باشد و می‌تواند از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو، ناهنجاری‌هایی را در سیستم تولید مثلی نر القا کند. مسمومیت آرسنیک، در حیوانات آزمایشگاهی موجب ناتوانی در عملکرد سلول‌های لیدیک شده و بدین ترتیب اثرات منفی را بر روی اسپرماتوژنز اعمال می‌نماید (3). تحقیقات نشان داده است که سدیم آرسنیت، موجب القای استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف بدن از جمله بیضه‌ها می‌شود. یکی از علل ناباروری در مردان، استرس اکسیداتیو و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)<sup>1</sup> می‌باشد. این ترکیب، یک عامل اکسیدکننده از گروه

رادیکال‌های آزاد است که تولید بیش از اندازه آن می‌تواند به اسپرم آسیب برساند (4). سدیم آرسنیت، 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 سدیم آرسنیت می‌تواند تعداد اسپرم‌های اپیدیدیم، قابلیت حیات و تحرک 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 فعال شامل: اپی‌گالوکاتچین‌گالات (EGCG)<sup>2</sup> و اپی‌گالوکاتچین (EC)<sup>3</sup> است (7). کاتچین، یکی از پلی‌فنل‌های موجود در چای سبز می‌باشد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما را افزایش می‌دهد و از بین‌برنده رادیکال‌های آزاد است. کاتچین - به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی - بر روی دستگاه تولید مثلی و همچنین بر روی تحریک تولید تستوسترون توسط سلول‌های لیدیک، کاهش محتوی کل کلسترول، تری‌گلیسرید و فسفولیپید بافت بیضه اثر می‌گذارد و همچنین مانع از جهش‌زایی حاصل از مواد شیمیایی جهش‌زا بر روی کروموزوم می‌گردد (8).

توانایی زنده ماندن، تحرک و لقاح اسپرم، به شدت وابسته به بیان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مؤثر آنها در پلاسما می‌باشد که چای سبز به علت غنی بودن پلی‌فنل‌ها به عنوان آنتی‌اکسیدان قوی، باعث مهار اکسیژن واکنش‌پذیر و گونه‌های نیتروژن می‌شود که در نهایت موجب افزایش کیفیت اسپرم می‌گردد (9).

از طرفی اثرات نامطلوب سدیم آرسنیت بر روی سیستم تولید مثلی نر ثابت شده است (3، 6). با توجه به نقش سمیت سدیم آرسنیت بر سیستم تولید مثلی نر و با توجه به وسعت پراکندگی این ماده در محیط زیست و خاصیت قوی آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سبز، مطالعه حاضر به منظور

<sup>2</sup> Epigallocatechin gallate<sup>3</sup> Epigallocatechin<sup>1</sup> Reactive Oxygen Species

دستورالعمل سازمان جهانی سلامت WHO<sup>1</sup> (WHO 1999) انجام شد و تعداد اسپرم در میلی‌لیتر مکعب محاسبه گردید.

### بررسی قابلیت تحرک اسپرم:

سنجش حرکت اسپرم بر اساس دستورالعمل WHO (WHO 1999) انجام شد؛ بدین ترتیب که ابتدا  $10\mu\text{l}$  از سوسپانسیون محیط کشت و اسپرم روی لام چمبر منتقل و حرکات اسپرم در گروه‌های مختلف، زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی  $20\times$  مورد بررسی قرار گرفت. حداقل 5 میدان دید میکروسکوپ برای تعیین قابلیت تحرک 200 اسپرم برای هر موش بررسی و درصد اسپرم‌های دارای حرکات پیشرونده، حرکات درجا و بدون حرکت محاسبه گردید.

### بررسی قابلیت حیات اسپرم:

برای سنجش قابلیت 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 37 درجه 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  $100\times$ ، 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 قابلیت حیات اسپرم، مورد استفاده قرار گرفت. برای هر نمونه، 100 اسپرم با بزرگنمایی

بررسی اثر عصاره هیدروالکلی چای سبز بر روی پارامترهای اسپرم و بافت بیضه موش‌های بالغ تیمار شده با سدیم آرسنیت صورت گرفت.

## روش تحقیق

### حیوانات و تیمار:

این تحقیق، بر روی موش‌های بالغ نژاد NMRI با وزن  $30\pm 5\text{gr}$  انجام شد. حیوانات، از انیستیتو پاستور ایران، خریداری و برای سازگاری با محیط، در شرایط استاندارد (دمای  $21\pm 2$  درجه سانتی‌گراد و نور محیطی با شرایط 12 ساعت تاریکی و 12 ساعت روشنایی)، به‌مدت 2 هفته 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 سدیم آرسنیت ( $5\text{mg/kg/day}$ ) (5، 6) (تهیه‌شده از شرکت مرک آلمان)، گروه چای سبز ( $100\text{mg/kg/day}$ ) (10) (تهیه‌شده از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج) و گروه چای سبز + سدیم آرسنیت قرار گرفتند. تیمار، به‌صورت دهانی از طریق گاواژ به‌مدت 34 روز (طول دوره کامل اسپرمتوزن 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  $1/5$  میلی‌لیتر محیط کشت Ham's F10 منتقل گردید و برای خروج اسپرم‌ها از آن محیط کشت، به چند قطعه برش داده شد. ده دقیقه بعد، 100 میکرولیتر سوسپانسیون محیط کشت حاوی اسپرم، با 900 میکرولیتر فیکساتیو فرمالین 2% (نسبت 1:9) رقیق شد. سپس سر اسپرم‌ها با استفاده از هموسیتمتر نتوبار، زیر میکروسکوپ، شمارش شد. شمارش اسپرم بر اساس

<sup>1</sup> World Health Organization

### رنگ آمیزی آنیلین بلو:

برای بررسی جایگزینی هیستون - پروتامین اسپرم، گسترش‌ها به وسیله آنیلین بلو (AB)<sup>2</sup> رنگ آمیزی شدند. رنگ آمیزی آنیلین بلو بر اساس دستورالعمل شرح داده شده به وسیله Wongand و همکاران انجام شد (13). به طور خلاصه، گسترش‌های اسپرم تهیه شده، به مدت 5 دقیقه در محلول فرمالین 4% ثابت شدند. لام‌ها، پس از شستشو با آب، در محلول آنیلین بلو (آنیلین بلو 5% در اسیداستیک 4%، pH=3/5)، به مدت 5 دقیقه رنگ آمیزی شدند. پس از شستشو با آب، لام‌ها در اتوزین 0/5% به مدت یک دقیقه قرار گرفتند و به طور 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 رنگ پذیری 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:

به منظور کنترل روش مذکور، از نمونه‌های کنترل مثبت استفاده شد؛ بدین منظور بیضه‌های موش نابالغ، در محیط کشت قطعه قطعه شد و از سوسپانسیون محیط کشت گسترش‌هایی تهیه گردید و به روش اشاره شده در فوق رنگ آمیزی شد.

### آماده سازی نمونه برای بررسی بافت بیضه:

بیضه چپ، بعد از خروج از بدن حیوان، در فیکساتیو MDF<sup>3</sup> قرار داده شد (14)؛ سپس برش گیری و پاساژ بافتی انجام شد. سرانجام به منظور بررسی تغییرات هیستومورفولوژیکی بیضه، لام‌های 5 میکرونی با روش هایدن‌هاین‌آزان (Heiden hain Azan) رنگ آمیزی شدند.

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

### کیفیت کروماتین اسپرم

#### رنگ آمیزی اکریدین اورانژ (AO):

گسترش نازکی از سوسپانسیون اسپرم، تهیه و اجازه داده شد تا در مقابل هوا خشک شود. برای بررسی تمامیت DNA اسپرم، از رنگ آمیزی اکریدین اورانژ (AO)<sup>1</sup> استفاده شد. رنگ آمیزی اکریدین اورانژ، بر اساس دستورالعمل شرح داده شده به وسیله Tejada و همکاران انجام شد (12)؛ به طور خلاصه، گسترش‌ها در محلول فیکساتیو متانول - اسیداستیک گلاسیال (به نسبت 3 به 1) به مدت 14 ساعت در دمای 4°C قرار داده شد و سپس به وسیله محلول رنگ کاری AO (رنگ 0/19% در بافر سترات فسفات pH=2/5)، به مدت 10 دقیقه رنگ آمیزی گردید. لام‌های رنگ گرفته، به مدت 5 دقیقه 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 رنگ پذیری، در سه گروه شامل: اسپرم‌های سبز رنگ (با DNA طبیعی)، اسپرم‌های زرد رنگ (حالت حد واسط) و اسپرم‌های قرم رنگ (با DNA دناتوره تک رشته‌ای) بررسی شدند.

### نمونه کنترل مثبت:

به منظور کنترل روش مذکور، از نمونه‌های کنترل مثبت استفاده شد؛ بدین منظور نمونه‌های اسپرم، از حیوان سالم و بالغ گرفته شد و سپس DNA این اسپرم‌ها، تحت تأثیر حرارت بالا (90 درجه سانتی گراد) به مدت 30 دقیقه دناتوره شد و پس از تهیه گسترش، نمونه‌ها به روش اشاره شده در فوق رنگ آمیزی شدند.

<sup>2</sup> Aniline blue

<sup>3</sup> Modified Davidson's Fluid

<sup>1</sup> Acridine orange

خاموشی (extinction coefficient) آن که عبارت است از  $1/56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$  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).

##### قابلیت تحرک اسپرم:

در موش‌های تیمار شده 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  $\pm$  انحراف معیار)

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

اندازه‌گیری قطر لوله‌های منی‌ساز، قطر لومن، ضخامت اپیتلیوم زایشی و قطر هسته اسپرماتوگونی با استفاده از نرم‌افزار 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 5 میکرونی 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)، تیوباریبوتیک‌اسید (TBA) (Thiobarbituric acid) 0/375% (gr/ml) و اسیدکلریدریک 0/25 نرمال، تهیه شد؛ سپس 0/5 میلی‌لیتر از نمونه سرم خونی، با یک میلی‌لیتر از محلول TBA-HCL-TCA مخلوط و به‌مدّت 15 دقیقه در بن‌ماری جوش، قرار داده شد. نمونه‌ها، بعد از خروج از بن‌ماری، به‌مدّت 10 دقیقه سانتیفریژ شدند و مایع رویی آنها به‌دقت جدا شد و جذب آن در 532 نانومتر در برابر blank که حاوی تمام ترکیبات به استثنای نمونه بود، خوانده شد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) (Malondialdehyde) با استفاده از ضریب

**تعداد اسپرم:**

سدیم آرسنیت+عصاره چای سبز، عصاره چای سبز توانسته است اثرات مخرب سدیم آرسنیت را در خصوص قابلیت حیات اسپرم در مقایسه با گروه سدیم آرسنیت به طور معنی داری جبران نماید (جدول 3).

بر طبق نتایج این مطالعه، میانگین تعداد اسپرم‌های اپیدیدیم در گروه سدیم آرسنیت در مقایسه با گروه کنترل، به طور معنی داری ( $P<0/001$ ) کاهش یافت؛ از طرفی میانگین تعداد اسپرم در گروه سدیم آرسنیت+عصاره چای سبز در مقایسه با گروه سدیم آرسنیت افزایش معنی داری نشان داد ( $P<0/001$ ) (جدول 3).

**ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم:**

موش‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت، افزایش معنی داری در ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم نشان دادند ( $P<0/001$ ). در گروه سدیم آرسنیت+عصاره چای سبز، عصاره چای سبز توانسته است، به طور معنی داری ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم را در مقایسه با گروه سدیم آرسنیت کاهش دهد ( $P<0/001$ ) (جدول 3). تعدادی از ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم شامل: قطره سیتوپلاسمی، سر آمورف (amorphous head) و دم پیچیده در گروه سدیم آرسنیت وجود دارد که در شکل یک نشان داده شده است.

**قابلیت حیات اسپرم:**

میانگین درصد اسپرم‌های زنده که معادل قابلیت حیات اسپرم می‌باشد، در گروه تیمار شده با سدیم آرسنیت در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری یافت ( $P<0/001$ )؛ از طرفی قابلیت حیات اسپرم در گروه سدیم آرسنیت+عصاره چای سبز در مقایسه با گروه سدیم آرسنیت، افزایش معنی داری را نشان داد ( $P<0/001$ ). به عبارت دیگر، به نظر می‌رسد در گروه

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

گروه‌ها	کنترل	سدیم آرسنیت	سدیم آرسنیت+چای سبز	چای سبز	سطح معنی داری
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 سدیم آرسنیت نسبت به گروه کنترل ( $P<0/001$ )

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

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

گروه‌ها	کنترل	سدیم آرسنیت	سدیم آرسنیت+چای سبز	چای سبز	سطح معنی داری
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 ( $\times 10^6$ )	10/42±1/30	6/00±1/13 a2	10/35±3/50 b2	11/38±5/19	P<0/001

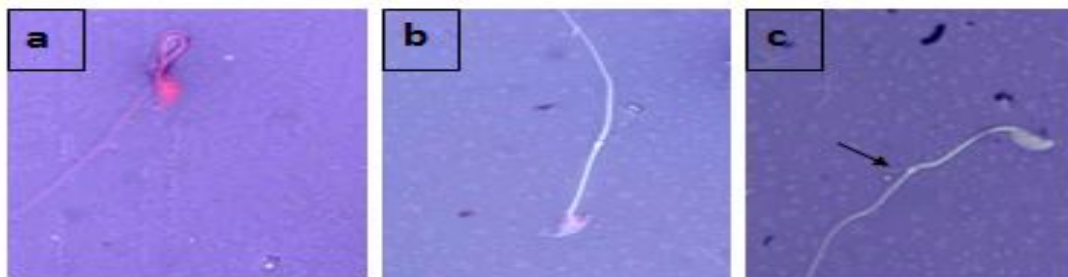
a: مقایسه آماری گروه سدیم آرسنیت نسبت به گروه کنترل a1: ( $P<0/01$ )، a2: ( $P<0/001$ )

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

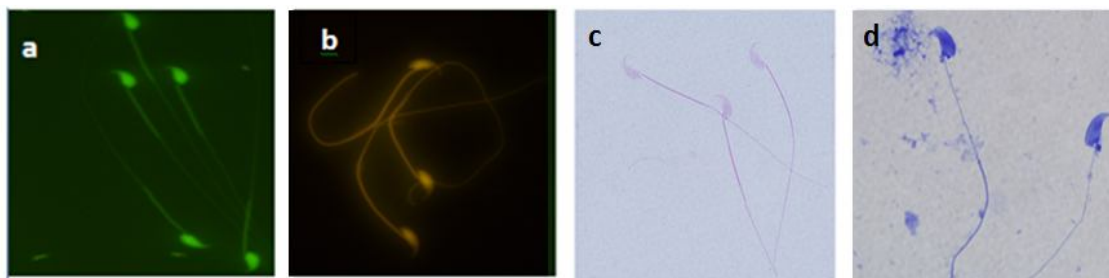
### کیفیت کروماتین اسپرم:

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).

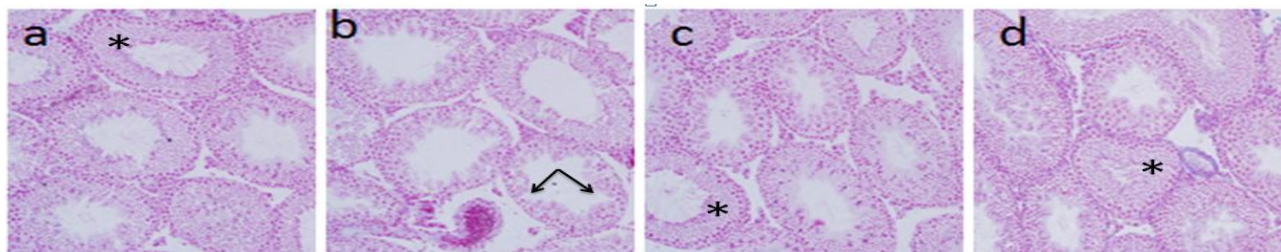
رنگ‌آمیزی گسترش‌های اسپرمی با AO نشان داد که تیمار موش‌ها با سدیم‌آرسنیت، در مقایسه با گروه کنترل، تأثیری روی دناتوره‌شدن ساختمان دورشته‌ای DNA اسپرم نداشت. برعکس، نمونه‌های کنترل مثبت شامل اسپرم‌هایی که DNA آنها توسط حرارت بالا دناتوره شده بودند، به رنگ نارنجی ظاهر شدند (شکل 2a-b)؛ علاوه بر



شکل 1- برخی از ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم در گروه تیمار شده با سدیم‌آرسنیت (5mg/kg/day)، رنگ‌آمیزی انوزین-نکروزین، بزرگنمایی  $\times 100$ : (a): دم پیچیده یا مجعد (Coiled or curled). (b): سر آمورف (amorphous head) (c): قطره سیتوپلاسمی



شکل 2- اسپرم‌های رنگ‌آمیزی شده توسط آکریدین اورانژ و آنیلین بلو، بزرگنمایی  $\times 100$ . رنگ‌آمیزی آکریدین اورانژ (a): گروه سدیم‌آرسنیت (5mg/kg/day). (b): نمونه کنترل مثبت. رنگ‌آمیزی آنیلین بلو. (c): گروه سدیم‌آرسنیت (5 mg/kg/day). (d): نمونه کنترل مثبت.



شکل 3- تصاویر میکروسکوپی از بافت بیضه موش‌های بالغ در گروه‌های مختلف تیمار شده با سدیم‌آرسنیت (5mg/kg/day) و عصاره چای سبز (100mg/kg/day). برش‌های 5 میکرونی، رنگ‌آمیزی هایدن-هاین آزان، بزرگنمایی  $\times 10$  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).

جدول 4- مقایسه میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز، قطر لومن، قطر هسته سلول‌های اسپرماتوگونی و ضخامت اپیتلیوم زایشی ( $\mu\text{m}$ ) در بافت بیضه و میانگین میزان مالون‌دی‌آلدئید در گروه‌های مختلف، 34 روز پس از تیمار با سدیم‌آرسنیت و عصاره چای سبز (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

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

### 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)؛ به عبارت دیگر، به نظر 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 بر این، نشان داده شد که عصاره چای سبز، اثر سمی سدیم‌آرسنیت بر روی این پارامترها را جبران می‌کند. در مطالعه حاضر، هیچ اختلاف معنی‌داری در وزن بیضه‌ها و بدن، در موش‌های تیمار شده 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

### قطر لومن، قطر لوله‌های منی‌ساز، قطر هسته سلول‌های اسپرماتوگونی و ضخامت اپیتلیوم زایشی ( $\mu\text{m}$ ):

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 تا حدودی تغییرات نامطلوب در قطر لوله‌های منی‌ساز و قطر لومن لوله‌های منی‌ساز و ضخامت اپیتلیوم زایشی را که در بافت بیضه موش‌های تیمار شده با سدیم‌آرسنیت ایجاد شده بود، ترمیم نماید (شکل 3c) (P<0/001).



این امر می‌تواند در تشدید اثرات اکسیداتیو سدیم‌آرسنیت روی کاهش قابلیت حیات اسپرم مؤثر باشد. کروماتین و تازک در اسپرم پستانداران، شامل مقادیر زیادی پروتامین غنی از تیول و گروه‌های سولفیدریل می‌باشد که به ترتیب در نگهداری از ثبات و قابلیت تحرک اسپرم دخالت دارند. احتمالاً کاهش در قابلیت تحرک اسپرم که در این تحقیق مشاهده شد، ممکن است به دلیل اتصال آرسنیک به گروه‌های تیول یا سولفیدریل پروتئین‌های اسپرم یا مهار آنزیم‌های میتوکندریایی مسؤول حرکت اسپرم باشد (3)؛ از طرفی، القای استرس اکسیداتیو توسط سدیم‌آرسنیت و پراکسید شدن اسیدهای چرب غشا، منجر به ازدست‌رفتن سیالیت غشا و کاهش در فعالیت آنزیم‌های غشا و کانال یونی و در نتیجه ازدست‌رفتن تدریجی تحرک و توانایی اسپرم‌ها برای اتصال به اووسیت می‌شود (22). احتمال داده شده است که کاهش قابلیت حیات و تحرک اسپرم توسط سدیم‌آرسنیت، از توانایی این سم در القای استرس اکسیداتیو ناشی می‌شود. عصاره چای سبز به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی، با مهار استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپید را در اسپرم کاهش داده و بدین ترتیب از مرگ اسپرم‌ها جلوگیری می‌نماید و همچنین از طریق افزایش سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی، موجب افزایش قابلیت حیات و تحرک اسپرم در گروه سدیم‌آرسنیت+عصاره چای سبز نسبت به گروه سدیم‌آرسنیت می‌شود (23). نتایج حاصل، افزایش قابل توجهی در ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم از جمله: دم پیچیده و سرآمورف در موش‌های تیمار شده 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 تیمار شده با سدیم‌آرسنیت، هیچ اختلاف معنی‌داری در کیفیت DNA اسپرم و جایگزینی هیستون-پروتامین نشان ندادند. آرسنیک، یک مخرب قوی غدد درون‌ریز است (25)؛ بنابراین احتمال دیگر برای تغییر پارامترهای اسپرم در این

بیضه‌ها و بدن در حیوانات تیمار شده با سدیم‌آرسنیت گزارش شده است (5، 6)؛ این نتایج ممکن است به دلیل مدت‌زمان تیمار یا دوزهای متفاوت سدیم‌آرسنیت باشد (18). در توافق با مطالعات قبلی (3)، نتایج پژوهش حاضر همچنین کاهش معنی‌داری در تعداد کل اسپرم‌ها در موش‌های تیمار شده با سدیم‌آرسنیت نشان داد. یک احتمال برای این اثر، ممکن است به دلیل کاهش هورمون‌هایی مثل: LH، FSH و تستوسترون باشد که در کاهش تعداد اسپرم‌ها مؤثر هستند (5)؛ از سوی دیگر گزارش شده است که سدیم‌آرسنیت به‌وسیله القای استرس اکسیداتیو، اثرات مضر روی اندام‌های مختلف از جمله بیضه‌ها اعمال می‌کند (3)؛ بنابراین فرض شده است که کاهش تعداد اسپرم می‌تواند از استرس اکسیداتیو القا شده 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 قابلیت حیات و قابلیت تحرک اسپرم‌های اپیدیمی بود. یک احتمال در کاهش قابلیت 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 آزاد شدن فاکتورهای آپوپتوزیک 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 قابلیت 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

مورفولوژی طبیعی اسپرم و همچنین قطر لوله‌های منی‌ساز، قطر لومن و ضخامت اپیتلیوم زایشی است؛ از طرفی سدیم‌آرسنیت، هیچ تأثیری روی کیفیت DNA اسپرم و جایگزینی پروتئامین به‌جای هیستون در موش‌های بالغ تیمار شده با این ماده سمی نداشت؛ همچنین، نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره چای سبز قادر است تا حدودی اثرات مضر سدیم‌آرسنیت بر روی تعداد، قابلیت تحرک، قابلیت 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.

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 اکسیداتی 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، قابلیت تحرک، قابلیت حیات،

### منابع:

- 1- Paul M, Frazier L. Reproductive Disorders. In: Levy BS, Wegman DH. Occupational Health: Recognizing and Preventing Work-Related Disease. 4<sup>th</sup> 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*. 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.

- 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, 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. *Toxicol Pathol.* 2002; 30(4): 524-33.
- 15- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52: 302-10.
- 16- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation 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 wistar 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<sub>2</sub>-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 clinical approach. *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.

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

Seyyed Mohammad Ali Shariatzadeh<sup>1</sup>, Maryam Mohammadi<sup>2</sup>

**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  $30 \pm 5$ g 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-way 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*

<sup>1</sup> Ph.D, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran.

<sup>2</sup> Corresponding author; MS.c, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran  
mohammadmaryam3286@gmail.com