

بررسی اثرات محافظتی نانواکسید روی بر بافت بیضه و سطح هورمون‌های جنسی موش‌های سوری پس از تیمار با فنیل هیدرازین

علی سلیمان‌زاده^{۱*}، عباس احمدی^۲

تاریخ دریافت ۱۳۹۶/۰۵/۳۰ تاریخ پذیرش ۱۳۹۶/۰۸/۰۳

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: فنیل‌هیدرازین می‌تواند سبب تغییرات ساختاری در بافت بیضه و سطح هورمونی شود. این مطالعه به‌منظور ارزیابی اثرات نانواکسیدروی متعاقب هیپوکسی القا شده توسط فنیل هیدرازین در موش سوری نر صورت پذیرفت.

مواد و روش کار: برای انجام این مطالعه تعداد ۷۲ سر موش سوری نر بالغ جوان ۶-۸ هفته‌ای، به‌صورت تصادفی به ۹ گروه تقسیم شدند: گروه ۱ (کنترل نرمال)، گروه دو (فنیل‌هیدرازین ۸ mg / ۱۰۰ gr/b.w/i.p.، برای بار اول و ۶ mg / ۱۰۰ gr/b.w/i.p.، هر ۴۸ ساعت یک‌بار)، گروه سه شم (دریافت‌کننده نرمال سالیین ۰/۱ ml/kg/ i.p.) دریافت کردند)، گروه چهار (فنیل‌هیدرازین و نانواکسیدروی ۱ mg/kg/ i.p.)، گروه پنج (فنیل‌هیدرازین و نانواکسیدروی ۲/۵ mg/kg/ i.p.)، گروه شش (فنیل‌هیدرازین و نانواکسیدروی ۵ mg/kg/ i.p.)، گروه هفت (نانواکسیدروی ۱ mg/kg/ i.p.)، گروه هشت (نانواکسیدروی ۲/۵ mg/kg/ i.p.) و گروه ۹ (نانواکسیدروی ۵ mg/kg/ i.p.). پس از طی ۳۵ روز تیمار، موش‌ها آسان کشتی شده و تغییرات مورفولوژیک و مورفومتریک و سطح سرمی تستوسترون، LH و FSH مورد ارزیابی قرار گرفت. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ مورد ارزیابی آماری قرار گرفتند و تمامی نتایج بر اساس میانگین $\pm$ خطای استاندارد بیان شدند. جهت مقایسه بین گروه‌ها نیز آنالیز واریانس یک‌طرفه مورداستفاده قرار گرفت و مقدار $P < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. **یافته‌ها:** گروهی که فقط فنیل‌هیدرازین دریافت کرده بود، کاهش معنی‌داری ($P < 0.05$) در سطح هورمون‌های جنسی، شاخص‌های اسپرماتوژنز، ضریب تمایز لوله‌ای، ضریب تجمعی، ضریب اسپرمیوژنز، ارتفاع اپیتلیوم زایگر و تعداد سلول‌های لیدیک، سرتولی و قطر لوله‌های منی‌ساز نشان داد و بافت بینابینی افزایش و ادماتوز یافته بود، که نانواکسیدروی در سایر گروه‌ها توانسته بود تا حدود زیادی سبب بهبود آن‌ها شود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان دادند که نانواکسیدروی در دوزهای پایین به‌خصوص در دوز ۲/۵ mg/kg می‌تواند از بافت بیضه و هورمون‌های جنسی در برابر واکنش‌های مخرب ناشی از فنیل‌هیدرازین نقش حفاظتی ایفا نمایند

کلیدواژه‌ها: فنیل‌هیدرازین، هیپوکسی، نانواکسیدروی، بیضه، موش سوری

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هشتم، شماره نهم، ص ۵۷۱-۵۶۰، آذر ۱۳۹۶

آدرس مکاتبه: ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو، پردیس نازلو، دانشکده دامپزشکی، گروه مامایی. تلفن: ۰۹۱۴۴۴۰۹۴۸۳، صندوق پستی: ۵۷۱۵۳۱۱۷۷

Email: a.soleimanzadeh@urmia.ac.ir

مقدمه

فنیل‌هیدرازین یک ماده شیمیایی قوی و اکسیدانی واجد خواص همولیتیک است که باعث سمیت در بافت‌های مختلف و در سطوح مختلف می‌شود که عمدتاً در صنعت، سموم صنعتی، آفت‌کش‌ها، مواد منفجره و در درمان سل و فشارخون بالا کاربرد دارد (۱). این ترکیب که دارای عوارض جانبی متعددی همچون کم‌خونی همولیتیک، اختلالات عروقی، کبدی، کلیوی، تنفسی، عصبی مرکزی و خود ایمن و بروز بدخیمی‌ها و ناهنجاری‌های ژنتیکی است، کارایی

درمانی این ماده را به‌شدت کاهش داده است (۱،۲). اکسیداسیون فنیل‌هیدرازین در بدن منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن، پی-ریزی تنش اکسیداتیو و پراکسیداسیون چربی‌ها شده و زمینه آسیب سلولی و افزایش میزان آپوپتوز را فراهم می‌آورد (۳،۴). از سوی دیگر، کم‌خونی همولیتیک ناشی از فنیل‌هیدرازین می‌تواند سبب افزایش میزان آهن بافتی در اثر لیز شدن گلبول‌های قرمز و هیپوکسی می‌گردد، در ضمن مقادیر بالای آهن بافتی، تشدید تولید گونه‌های فعال اکسیژن را در پی خواهد داشت (۵،۶). گزارش‌ها نشان

^۱ استادیار گروه مامایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

^۲ دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

کیفیت پارامترهای اسپرم، بافت بیضه و فاکتورهای استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی دیابتی شده، گردد (۲۰). بر این اساس هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات محافظتی نانو اکسیدروی بر جلوگیری از آسیب‌های ناشی از هیپوکسی بر بافت بیضه و میزان هورمون‌های جنسی در موش سوری بالغ است.

مواد و روش کار

در این مطالعه از فنیل‌هیدرازین (Sigma Aldrich; CAT: P6926; Germany) جهت القاء کم‌خونی همولیتیک استفاده شد (۱). همچنین نانوذرات اکسید روی (US Research Nanomaterials, Inc.; CAT: US3590; USA) مورد استفاده قرار گرفت.

به‌منظور انجام مطالعه حاضر از ۷۲ سر موش سوری نر بالغ نژادان ام آر ای (NMRI Institute) جوان ۶-۸ هفته‌ای، با میانگین وزنی 20 ± 3 گرم که از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه شده بود استفاده شد. حیوانات در شرایط محیطی فاقد پاتوژن و تحت شرایط استاندارد دمایی ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) و رطوبت ($50 \pm 10\%$) و با سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی کامل به آب و غذای کافی در محل مراقبت از حیوانات دانشکده دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه نگهداری شدند. در این بررسی موش‌ها به‌صورت تصادفی به ۹ گروه (در هر گروه ۸ سر) تقسیم شدند و طی ۳۵ روز مورد بررسی قرار گرفتند: گروه کنترل بدون دریافت هیچ دارویی: حیوانات این گروه به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شده و سرم فیزیولوژی (۰/۱ ml/day/i.p.) دریافت کردند. گروه فنیل‌هیدرازین: حیوانات این گروه فنیل‌هیدرازین را به روش تزریق داخل صفاقی با دز $8 \text{ mg} / 100 \text{ gr/b.w/i.p.}$ برای بار اول و $6 \text{ mg} / 100 \text{ gr/b.w/i.p.}$ هر ۴۸ ساعت یک‌بار دریافت نمودند (۲۱). گروه سوم: گروه دریافت‌کننده نرمال سالین (۰/۱ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن/داخل صفاقی)، گروه چهارم: گروه دریافت‌کننده فنیل‌هیدرازین و نانو اکسیدروی (۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن/داخل صفاقی) (۱۸). گروه پنجم: گروه دریافت‌کننده فنیل‌هیدرازین و نانو اکسیدروی (۲/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن). گروه ششم: گروه دریافت‌کننده فنیل‌هیدرازین و نانو اکسیدروی (۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن). گروه هفتم: گروه دریافت‌کننده نانو اکسیدروی (۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن). گروه هشتم: گروه دریافت‌کننده نانو اکسیدروی (۲/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن). گروه نهم: گروه دریافت‌کننده نانو اکسیدروی (۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن).

می‌دهند هیپوکسی در جوندگان نر از سنتز و آزاد شدن گونادوتروپین‌ها جلوگیری می‌کند (۷،۸). همچنین نشان داده شده است که هیپوکسی مزمن اسپرماتوژنز را در موش‌های صحرایی و میمون متوقف می‌کند (۹). در مطالعه دیگری مشخص شده است که هیپوکسی عامل تأثیر قطعی روی دستگاه تناسلی نر است و می‌تواند در بیضه عامل تخریب کیفیت اسپرم باشد (۱۰).

در شرایط عادی آنتی‌اکسیدان‌ها قادر به مقابله با اثرات مضر ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشند، بنابراین می‌توانند از استرس اکسیداتیو جلوگیری کنند. آنتی‌اکسیدان‌ها به انواع آنزیمی و غیر آنزیمی تقسیم می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی شامل آنتی‌اکسیدان‌های متابولیک و غذایی است. آنتی‌اکسیدان‌های غذایی شامل ویتامین‌های A، E، C، بتاکاروتن و مواد معدنی مانند سلنیوم، مس، و روی است (۱۱،۱۲). یافته‌های جدید نشان می‌دهد که آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی نقش مهمی در تکوین سیستم تولیدمثلی انسان و باروری دارند. از میان آن‌ها، روی به‌عنوان یک ماده معدنی و آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی، می‌تواند به‌عنوان عامل کمکی (Cofactor) بیش از ۳۰۰ متالوآنزیم شرکت‌کننده در متابولیسم پروتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، رونویسی DNA و سنتز پروتئین عمل کند (۱۳). به دلیل این‌که رونویسی DNA بخش مهمی از تکوین سلول‌های جنسی است، روی عنصری حیاتی برای تولیدمثل محسوب می‌شود (۱۴). خواص آنتی‌اکسیدانی روی در سیستم‌های بیوشیمیایی مشخص است و به نظر می‌رسد بخشی از این فعالیت مستقل از فعالیت متالوآنزیمی روی است (۱۵). نانو اکسیدروی (nano-ZnO)، ماده جدیدی است که با استفاده از علم نانوتکنولوژی تولید و به بازار عرضه شده است. تغییر اندازه ذرات به نانوذره (اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر) سبب افزایش نسبت سطح به حجم و تغییر در سایر خصوصیات آن‌ها می‌شود. افزایش سطح تماس در نانوذرات اجازه می‌دهد که فعل‌وانفعالات این ماده با مولکول‌های آلی و غیر آلی به‌صورت متفاوتی صورت گیرد (۱۶). در مقایسه با اکسید روی، نانو اکسیدروی دارای فعالیت شیمیایی قوی‌تر بوده و می‌تواند در واکنش‌های اکسیداسیون با انواع ترکیبات آلی شرکت نماید. علاوه بر این به دلیل نفوذپذیری بیشتر، نانو اکسیدروی می‌تواند اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری داشته باشد (۱۷). در مطالعه‌ای نشان داده شده است که نانو اکسیدروی در دوز پایین می‌تواند اثرات محافظتی در سلول‌ها در برابر اثرات مخرب دوکساروبوسین در موش‌های صحرایی داشته باشد (۱۸). در بررسی دیگر بر روی موش‌های کوچک آزمایشگاهی نشان داده شده است که ذرات نانو اکسید روی می‌تواند سبب بهبود و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شود (۱۹). عفیفی و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که نانوذرات اکسید روی می‌تواند سبب بهبود

نمونه برداری از موش های سفید کوچک آزمایشگاهی، ۲۴ ساعت پس از آخرین تیمار، به وسیله کتامین (۴۵ mg/kg; i.p.) و زایلازین (۳۵ mg/kg; i.p.) بی هوش و آسان کشی شده (۲۲) و نمونه های خون توسط سرنگ های استریل به صورت مستقیم از قلب جمع آوری گردیدند. جهت به دست آوردن سرم، نمونه ها به مدت پنج دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند و سرم ها تا زمان سنجش هورمونی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برای سنجش هورمون تستوسترون، از روش الایزا و با استفاده از کیت اختصاصی (Demeditec Diagnostics GmbH, Germany) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین اندازه گیری هورمون های LH و FSH به روش الایزا و با استفاده از کیت اختصاصی (Amersham, Buckinghamshire, UK) مورد استفاده قرار گرفت (۲۳).

در مرحله بعد، بافت بیضه جدا شده و به منظور تثبیت به مدت ۴۸ ساعت به ظروف حاوی فرمالین ۱۰ درصد انتقال داده شد. پس از تثبیت نمونه ها و تهیه مقاطع بافتی، رنگ آمیزی با هماتوکسیلین-اوتوزین انجام شد، سپس با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. میانگین ضخامت کپسول بیضه بر حسب میکرومتر اندازه گیری شد. قطر لوله سمینی فروس توسط عدسی مدرج مورد بررسی قرار گرفت (۲۴). ضخامت اپیتلیوم نیز با بزرگنمایی $\times 400$ از اسپرmatogoni های موجود در غشای پایه یک طرف لوله تا جایی که اسپرماتیدها وجود داشتند بر اساس میکرومتر با عدسی مدرج محاسبه و لوله های سمینی فروس با مقطع گرد یا نزدیک به گرد مورد بررسی قرار گرفت (۲۵). برای اندازه گیری اپی تیوم لوله های منی ساز در مقطع عرضی ۲۰ لوله از پایخ بازال تا انتخابی آخرین هسته در لومن اندازه گیری صورت گرفت، همچنین برای اندازه گیری میانگین قطر لوله ها، دو قطر عرضی از لوله که دارای برش عرضی کامل بودند اندازه گیری و میانگین آن ها به دست آمد (۲۵).

برای ارزیابی اسپرماتوژنز در بافت بیضه تعداد ۱۰۰ لوله منی ساز در هر بیضه جهت ارزیابی شاخص های زیر مورد بررسی قرار گرفتند بدین ترتیب که، جهت تعیین ضریب تمایز لوله ای، درصد لوله های منی سازی که دارای سه و یا بیش تر از سه رده سلول های اسپرماتوژنز تمایز یافته از سلول اسپرماتوگونی A بودند، محاسبه گردید (۲۶)، همچنین ضریب اسپرمیوژنز مورد بررسی قرار گرفت که این شاخص بیانگر درصد لوله های منی ساز دارای اسپرمیوژنز طبیعی (حاوی اسپرم) در نمونه ی بافتی می باشد (۲۴). همچنین جهت تعیین ضریب بازسازی، درصد لوله های منی سازی که در آن ها سلول های اسپرماتوگونی نوع A به هسته روشن به رده اسپرماتوگونی بینابینی یا نوع B رسیده بودند (درصد اسپرماتوگونی B نسبت A) جهت ارزیابی این شاخص محاسبه گردید (۲۷).

برای بررسی و شمارش سلول های سرتولی و لیدیگ، مقطع عرضی ۲۰ لوله سمینی فروس (تقریباً یک اندازه) در هر بیضه انتخاب شد، در هر لوله تعداد سلول های سرتولی و همچنین در بافت بینابینی مربوط به هر بیضه در ۲۰ میدان میکروسکوپی تعداد سلول های لیدیگ شمارش شد (۲۸). هسته سلول های سرتولی اغلب مثلثی، هرمی نامنظم و یوکروماتین می باشد و این سلول ها حاوی یک هسته واضح می باشند (۲۸). سلول های لیدیگ نیز برخلاف سایر سلول های ذکر شده در خارج سمینی فروس و در بافت بینابینی و اغلب به صورت گروهی قابل رویت بودند، سلول های لیدیگ اسیدوفیل دارای هسته گرد با موقعیت مرکزی و یک یا دو هسته مشخص می باشند (۲۸). همچنین سلول های اسپرماتوگونی بر روی غشاء پایه قرار دارند و دارای هسته یوکروماتین بیضی شکل همراه با یک یا ۲ هسته هستند این سلول ها دارای دو گروه تیره و روشن هستند و در این مطالعه هر دو نوع سلول تحت یک عنوان بررسی شد. اسپرماتوسیت اولیه نیز بین غشاء پایه و سلول های گرد کوچک اسپرماتید گرد، در چند طبقه سلول های درشت تری بنام اسپرماتوسیت اولیه به چشم می خورد که هسته آنها در مراحل مختلف میوز، لپتوتن، زیگوتن پاکی تن، دیپلوتن دیاکینز بودند و در مطالعه ما همه آنها تحت یک گروه اسپرماتوسیت اولیه بررسی می شدند (۲۸).

آنالیز آماری:

داده های این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ مورد ارزیابی آماری قرار گرفتند و نتایج به صورت میانگین (M) و خطای استاندارد (SE) (Mean) و (standard error) بیان شدند. جهت مقایسه بین گروه ها، آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و به دنبال آن تست های مقایسه ای چندگانه توکی (Tukey) مورد استفاده قرار گرفت. مقدار $P < 0.05$ برای تعیین سطح معنی داری بین گروه ها در نظر گرفته شد.

یافته ها

ارزیابی هورمون های جنسی:

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه (جدول ۱)، غلظت سرمی هورمون تستوسترون، در گروه فنیل هیدرازین، در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری ($P < 0.05$) یافته است. همچنین غلظت سرمی این هورمون در گروه هایی که فنیل هیدرازین را همراه با نانو اکسیدروی دریافت کرده بودند نسبت به گروه فنیل هیدرازین، گروه های فنیل هیدرازین+نانو اکسیدروی ۲/۵ mg/ml و فنیل هیدرازین+نانو اکسیدروی ۵ mg/ml افزایش معنی داری ($P < 0.05$) یافته بود (جدول ۱).

($P < 0.05$) داشتند اما نسبت به گروه فنیل هیدرازین به طور معنی داری ($P < 0.05$) افزایش یافته بودند (جدول ۱). همچنین میزان ترشح این هورمون ها در گروه فنیل هیدرازین به طور معنی داری ($P < 0.05$) نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود.

علاوه بر این، نتایج نشان داد که سطح هورمون LH و FSH، در گروه های فنیل هیدرازین + ۱ mg/ml نانواکسیدروی، فنیل هیدرازین + ۲/۵ mg/ml نانواکسیدروی و فنیل هیدرازین + ۵ mg/ml نانواکسیدروی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری

جدول (۱): هورمون های جنسی در گروه های تحت درمان با فنیل هیدرازین و نانواکسیدروی

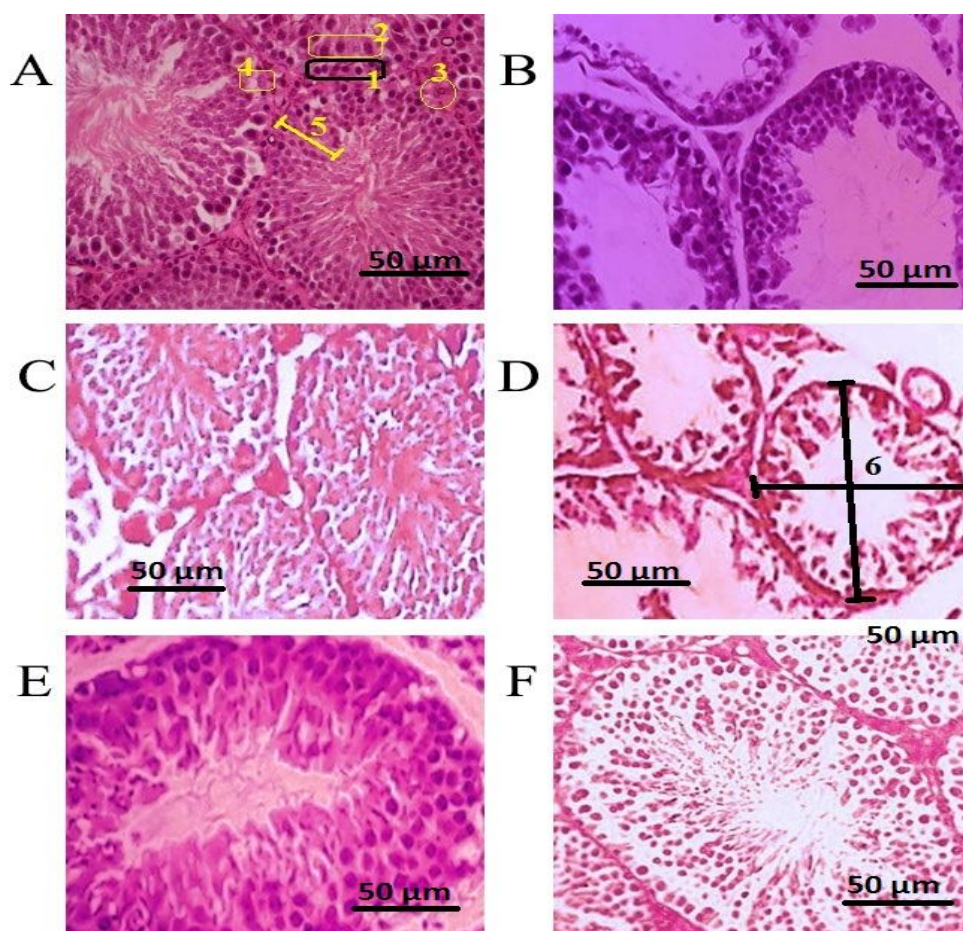
FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	Testosterone (μ mol/L)	
۴/۲۳ $\pm$ ۱/۰۶	۲/۶۹ $\pm$ ۰/۹۴	۶/۷۵ $\pm$ ۱/۳۹	کنترل
۱/۰۵ $\pm$ ۱/۳۴ ^a	۰/۷۳ $\pm$ ۱/۱۸ ^a	۳/۱۷ $\pm$ ۱/۰۵ ^a	فنیل هیدرازین
۴/۲۰ $\pm$ ۱/۲۳	۲/۶۸ $\pm$ ۱/۳۰	۶/۷۳ $\pm$ ۱/۱۲	شم
۱/۸۳ $\pm$ ۱/۱۹ ^a	۰/۹۲ $\pm$ ۱/۱۷ ^a	۳/۲۵ $\pm$ ۱/۱۲ ^a	فنیل هیدرازین + ۱ mg/ml نانواکسیدروی
۲/۹۷ $\pm$ ۱/۴۱ ^a	۱/۸۳ $\pm$ ۱/۴۱ ^a	۴/۶۷ $\pm$ ۱/۱۸ ^a	فنیل هیدرازین + ۲/۵ mg/ml نانواکسیدروی
۲/۴۱ $\pm$ ۱/۰۳ ^a	۱/۳۹ $\pm$ ۱/۶۸ ^a	۴/۰۳ $\pm$ ۱/۲۳ ^a	فنیل هیدرازین + ۵ mg/ml نانواکسیدروی
۴/۲۲ $\pm$ ۱/۱۹	۲/۶۸ $\pm$ ۱/۲۹	۶/۷۵ $\pm$ ۰/۳۶	۱ mg/ml نانواکسیدروی
۴/۶۹ $\pm$ ۱/۳۶ ^a	۲/۸۰ $\pm$ ۱/۱۳	۶/۹۴ $\pm$ ۱/۵۷	۲/۵ mg/ml نانواکسیدروی
۴/۵۷ $\pm$ ۱/۲۰ ^a	۲/۷۲ $\pm$ ۱/۴۷	۶/۷۸ $\pm$ ۱/۲۶	۵ mg/ml نانواکسیدروی
$P < 0.05$	$P < 0.01$	$P < 0.05$	P value

*a. نشانگر اختلاف معنی دار با گروه کنترل؛ (Mean $\pm$ SD) (داده ها به صورت ستونی باهم مقایسه شدند).

در این دوز نتوانسته بود از هم گسیختگی و ادماتوز در لوله ها را بهبود چندان دهد (تصویر ۱). در گروه دریافت کننده فنیل هیدرازین و نانواکسیدروی (۲/۵ mg/kg) لوله های منی ساز تا حد زیادی شرایط بهتری نشان داده و اپیتلیوم زایگر دارای انسجام بیشتری نسبت به گروه فنیل هیدرازین بوده و حالت گسیختگی کمتری در لوله ها مشاهده شد (تصویر ۱). در گروه فنیل هیدرازین و نانواکسیدروی (۵ mg/kg) ظاهر بافت شناسی بیضه در این گروه نشان می دهد که بافت بینابینی دارای انسجام بیشتری نسبت به گروه فنیل هیدرازین و گروه فنیل هیدرازین و نانواکسیدروی (۱ mg/kg) بوده ولی اپیتلیوم زایگر همچنان حالت گسیختگی را نشان داد، ولی دارای ضخامت قابل توجهی بود. ظاهر بافت شناسی بیضه در گروه های دریافت کننده نانواکسیدروی به تنهایی شبیه گروه کنترل بوده و موارد خاصی که متفاوت از گروه کنترل باشد مشاهده نگردید (تصویر ۱).

ارزیابی هیستولوژی:

مطالعه بافت شناسی بیضه در گروه دریافت کننده فنیل هیدرازین نشان داد که در تعدادی از لوله های منی ساز سری سلول های اسپرماتوزوئید حالت گسیخته شده نشان می دهند و از یکدیگر جدا شده اند، همچنین در این گروه اغلب لوله های منی ساز فاقد اسپرماتوزوئیدهای در حال تکامل بوده و به نظر می رسد که اپیتلیوم دارای ضخامت کم است، در این گروه بعضی از لوله ها کاملاً خالی از سلول های سری اسپرماتوزوئز شده و شکل هیالینی نشان می دهند. در بافت بینابینی در بعضی نواحی حالت ادماتوز مشاهده می شود ولی این حالت خیلی زیاد نیست (تصویر ۱). در گروه دریافت کننده نرمال سالین (شم) لوله های منی ساز با گروه کنترل مشابهت داشت و شرایط از هم گسیختگی و ادماتوز در آن ها دیده نشد (تصویر ۱). در گروه دریافت کننده فنیل هیدرازین و نانواکسیدروی (۱ mg/kg) لوله های منی ساز مشابه با گروه فنیل هیدرازین بود و نانواکسیدروی



تصویر (۱): تصویر میکروگراف از لوله های اسپرم ساز و سلول های زایگر. درشت نمایی X400 رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین. A: گروه کنترل: بافت بینابینی در بین لوله های منی ساز و اپیتلیوم زایگر لوله های منی ساز دارای ضخامت قابل توجهی می باشد- ۱: سلول های اسپرماتوگونی (کوچک ترین رده سلول های اسپرماتوژنز)، ۲- سلول های اسپرماتوسیت I (بزرگ ترین رده سلول های رده لسپرماتوژنز)، ۳- سلول های لیدیک (با سیتوپلاسم پررنگ و هسته روشن در بافت بینابینی مشخص هستند)، ۴- سلول های سرتولی، ۵- نحوه اندازه گیری قطر اپیتلیوم لوله های منی ساز، ۶- نحوه اندازه گیری میانگین قطر لوله های منی ساز؛ B) گروه دریافت کننده فنیل هیدرازین به تنهایی: ضخامت بافت بینابینی و اپی تلیوم زایگر به طور مشخص کاهش یافته و سلول های اپیتلیوم زایگر دارای حالت گسیخته شده می باشد؛ C) گروه دریافت کننده نرمال سالین (شم)؛ D) گروه دریافت کننده فنیل هیدرازین و نانو اکسیدروی (1 mg/kg): تخریب حاصل از تجویز فنیل هیدرازین به طور مشخص با نانو اکسید روی جلوگیری شده است؛ E) گروه دریافت کننده فنیل هیدرازین و نانو اکسیدروی (5/2 mg/kg): تخریب حاصل از تجویز فنیل هیدرازین به طور مشخص با نانو اکسید روی جلوگیری شده است؛ F) گروه دریافت کننده فنیل هیدرازین و نانو اکسیدروی (5 mg/kg): تخریب حاصل از تجویز فنیل هیدرازین به طور مشخص با نانو اکسید روی جلوگیری شده است

هیستومورفومتري:

ضخامت اپیتلیوم زایگر:

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میانگین ضخامت اپیتلیوم زایگر (تصویر ۱) در گروه فنیل هیدرازین نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری ($P < 0.05$) نشان داد. همچنین نشان داده شد که در گروهی که فنیل هیدرازین را با ۲/۵ mg/ml نانو اکسیدروی دریافت کرده بودند به طور معنی داری ($P < 0.05$)

نسبت به بقیه گروه هایی که به تنهایی و یا با دوزهای دیگر نانو اکسیدروی را دریافت کرده بودند بهبودی یافته بودند ولی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری ($P < 0.05$) داشتند (جدول ۲).

ضخامت کپسول بیضه:

اندازه گیری ضخامت کپسول بیضه نشان داد که در اثر درمان با فنیل هیدرازین به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد ($P < 0.05$)، ولی در گروه های دریافت کننده نانو اکسیدروی به

همراه فنیل هیدرازین، نشان داده شد که نانواکسیدروی باعث گردید که ضخامت کپسول افزایش زیادی پیدا نکند و نسبت به گروه فنیل هیدرازین به طور معنی داری ($P < 0.05$) کاهش نشان داد (جدول ۲).

میانگین تعداد سلول های سرتولی:

نتایج حاصل از بررسی نشان داده شد که میانگین تعداد سلول های سرتولی فعال (تصویر ۱) در یک لوله منی ساز از بافت بیضه در گروه فنیل هیدرازین نسبت به گروه کنترل و شم کاهش معنی داری یافته بود ($P < 0.05$). همچنین این بررسی نشان داد که سایر گروه های تحت درمان که فنیل هیدرازین را به همراه با نانواکسیدروی و یا به تنهایی نانواکسیدروی را دریافت کرده بودند اختلاف معنی داری با گروه کنترل نداشتند (جدول ۲).

سلول های لیدیگ:

بررسی میانگین تعداد سلول های لیدیگ (تصویر ۱) در سطح یک میلی متر مربع از بافت بیضه نشان داد که میانگین تعداد

سلول های لیدیگ به طور معنی داری ($P < 0.05$) در گروه فنیل هیدرازین نسبت به گروه کنترل و شم کاهش یافته بود. این در حالی است که نانواکسیدروی در دوزهای ۲/۵ mg/ml و ۵ mg/ml توانسته بود سبب بهبودی معنی داری ($P < 0.05$) نسبت به گروه فنیل هیدرازین شود (جدول ۲).

قطر لوله های منی ساز:

بررسی و اندازه گیری قطر لوله های منی ساز (تصویر ۱) نشان داد که میانگین قطر این لوله ها در گروه فنیل هیدرازین کاهش چشمگیری نسبت به گروه کنترل و سایر گروه ها شده است، همچنین نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که نانواکسیدروی در گروه هایی که به همراه فنیل هیدرازین استفاده شد، توانست تا حدی سبب بهبود میانگین قطر لوله های منی ساز شود، اما در بین گروه هایی که نانواکسیدروی را به تنهایی دریافت کرده بودند اختلاف معنی داری وجود نداشت (جدول ۲).

جدول (۲): هیستومورفومتری پارامترهای مختلف بافت بیضه در گروه های تحت درمان با فنیل هیدرازین و نانواکسیدروی

ضخامت اپیتلیوم زایگر (μm)	ضخامت کپسول بیضه (μm)	سلول سرتولی در یک لوله منی ساز (cell/mm2)	سلول های لیدیگ (cell/mm2)	قطر لوله های منی ساز (μm)
۶۲/۳۱ ± ۰/۹۳	۱۲/۳۵ ± ۱/۰۶	۱۷/۲۵ ± ۱/۳۹	۳۲۱/۸۴ ± ۱/۱۲	۱۹۳/۳۵ ± ۱/۴۵
۳۱/۱۴ ± ۰/۳۹ a	۲۶/۱۹ ± ۰/۵۸ a	۱۱/۰۶ ± ۱/۱۸ a	۱۴۵/۷۷ ± ۱/۳۴ a	۱۱۸/۴۹ ± ۱/۷۵ a
۶۰/۴۳ ± ۱/۰۸	۱۲/۲۴ ± ۱/۱۷	۱۷/۱۰ ± ۱/۰۷	۳۱۹/۱۷ ± ۰/۶۷	۱۹۲/۸۶ ± ۱/۰۴
۳۹/۲۹ ± ۰/۵۴ a	۲۰/۰۷ ± ۱/۲۴ a	۱۶/۳۳ ± ۱/۱۴	۱۵۰/۲۳ ± ۱/۵۲ a	۱۲۸/۱۵ ± ۱/۹۰ a
۴۶/۱۳ ± ۱/۳۰ a	۱۳/۳۶ ± ۱/۱۳	۱۶/۷۵ ± ۰/۸۳	۲۰۷/۶۴ ± ۰/۹۱ a	۱۶۲/۰۹ ± ۱/۱۹ a
۳۷/۷۰ ± ۱/۶۴ a	۱۸/۶۳ ± ۱/۰۹ a	۱۵/۱۱ ± ۱/۴۷	۱۷۴/۱۵ ± ۱/۳۹ a	۱۳۹/۴۷ ± ۰/۸۹ a
۶۰/۳۴ ± ۱/۳۰	۱۳/۴۷ ± ۱/۱۳	۱۶/۴۷ ± ۱/۱۱	۳۱۳/۹۲ ± ۱/۰۲ a	۱۹۰/۲۰ ± ۱/۰۸
۶۱/۲۲ ± ۱/۱۵	۱۳/۰۸ ± ۰/۸۱	۱۶/۹۰ ± ۱/۲۷	۳۱۷/۴۴ ± ۱/۲۸	۱۹۱/۳۹ ± ۱/۳۳
۶۰/۷۹ ± ۱/۴۱ a	۱۳/۵۶ ± ۱/۱۷	۱۶/۲۳ ± ۱/۱۶	۳۱۴/۸۵ ± ۱/۴۰ a	۱۹۰/۱۳ ± ۱/۶۱
P < ۰/۰۵	P < ۰/۰۱	P < ۰/۰۵	P < ۰/۰۵	P < ۰/۰۱

*a. نشانگر اختلاف معنی دار با گروه کنترل؛ (Mean±SD) (داده ها به صورت ستونی باهم مقایسه شدند).

اسپرما توسیت نوع I:

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که شمارش پراکندگی اسپرما توسیت نوع I (تصویر ۱) در سطح یک میلی متر مربع از بافت بیضه در گروه تحت درمان با فنیل هیدرازین نسبت به گروه کنترل

و شم به طور معنی داری ($P < 0.05$) کاهش یافته است. همچنین مشخص گردید که میانگین تعداد این سلول ها در گروه های ۴، ۵ و ۶ که فنیل هیدرازین را به همراه نانواکسیدروی دریافت کرده بودند نسبت به گروه فنیل هیدرازین بهبود معنی داری ($P < 0.05$) یافته

است، اما همچنان از گروه کنترل کاهش معنی‌داری ($P < 0.05$) داشتند (جدول ۳).

ارزیابی ضریب تجمعی (RI):

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که، درصد میانگین سلول‌های اسپرماتوگونی نوع B نسبت به نوع A که نشان‌دهنده ضریب تجمعی مثبت است نشان داد که ضریب تجمعی مثبت در گروه فنیل‌هیدرازین نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) کاهش نشان داده است. همچنین در گروه‌هایی که فنیل‌هیدرازین را با نانواکسیدروی با دوزهای ۲/۵ mg/ml و ۵ mg/ml دریافت کرده بودند، ضریب تجمعی افزایش معنی‌داری ($P < 0.05$) یافته بود، اما در گروهی که فنیل‌هیدرازین را با دوز ۱ mg/ml نانواکسیدروی دریافت کرده بودند اختلافی با گروه فنیل‌هیدرازین نداشت (جدول ۳).

ارزیابی ضریب اسپرمیونز (SI):

بررسی میانگین درصد لوله‌های منی‌ساز که حاوی سلول‌های در حال تمایز در مرحله اسپرمیونز بودند در گروه فنیل‌هیدرازین نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری ($P < 0.05$) یافته بود. همچنین

گروه‌های ۴، ۵ و ۶ که به همراه فنیل‌هیدرازین، نانواکسیدروی دریافت کرده بودند، میانگین درصد لوله‌های منی‌ساز به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) افزایش‌یافته بود، اما نسبت به گروه کنترل، شم و گروه‌هایی که نانواکسیدروی را به‌تنهایی (گروه‌های ۷، ۸ و ۹) دریافت کرده بود کم‌تر بود (جدول ۳).

ارزیابی درصد تمایز لوله‌ای (TDI):

نتایج حاصل از بررسی درصد لوله‌هایی که دارای بیش از سه ردیف سلول (TDI مثبت) نشان داد که میانگین درصد TDI مثبت در گروه فنیل‌هیدرازین نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) کاهش نشان داده است. همچنین در گروه‌های فنیل‌هیدرازین + ۲/۵ mg/ml نانواکسیدروی و گروه فنیل‌هیدرازین + ۵ mg/ml نانواکسیدروی میانگین درصد TDI مثبت افزایش معنی‌داری ($P < 0.05$) یافته بود، اما گروه فنیل‌هیدرازین + ۱ mg/ml نانواکسیدروی فاقد اختلاف معنی‌دار با گروه فنیل‌هیدرازین بود، همچنین بین گروه‌هایی که نانواکسیدروی را به‌تنهایی دریافت کرده بودند با گروه کنترل و شم فاقد اختلاف معنی‌دار بود (جدول ۳).

جدول (۳): ارزیابی تعداد اسپرماتوسیت نوع I، ضریب تجمعی، ضریب اسپرماتوژنز و تمایز لوله‌ای در گروه‌های فنیل‌هیدرازین و نانواکسیدروی

اسپرماتوسیت نوع I (cell/ mm ²)	ضریب تجمعی RI (%)	ضریب اسپرماتوژنز SI (%)	تمایز لوله‌ای TDI (%)
کنترل	۶۴۱/۱۷ ± ۱/۵۱	۷۳/۷۵ ± ۱/۱۷	۸۷/۱۴ ± ۱/۲۹
فنیل‌هیدرازین	۴۹۳/۵۰ ± ۱/۰۳ ^a	۳۶/۷۳ ± ۱/۴۰ ^a	۶۳/۲۹ ± ۱/۱۲ ^a
شم	۶۳۹/۰۸ ± ۱/۲۲	۷۲/۳۰ ± ۱/۵۹	۸۷/۱۰ ± ۱/۳۰
فنیل‌هیدرازین + ۱ mg/ml نانواکسیدروی	۴۹۶/۷۶ ± ۱/۱۶ ^a	۴۰/۰۸ ± ۱/۱۹ ^a	۶۷/۴۵ ± ۱/۵۳ ^a
فنیل‌هیدرازین + ۲/۵ mg/ml نانواکسیدروی	۵۴۹/۲۱ ± ۱/۲۹ ^a	۵۹/۴۷ ± ۱/۴۸ ^a	۷۷/۹۸ ± ۱/۱۳ ^a
فنیل‌هیدرازین + ۵ mg/ml نانواکسیدروی	۵۱۳/۶۶ ± ۱/۶۹ ^a	۵۰/۱۰ ± ۱/۳۶ ^a	۷۳/۳۸ ± ۱/۲۴ ^a
۱ mg/ml نانواکسیدروی	۶۱۹/۳۰ ± ۱/۱۴ ^a	۷۲/۱۹ ± ۱/۳۸	۸۵/۵۱ ± ۱/۴۴
۲/۵ mg/ml نانواکسیدروی	۶۲۸/۰۷ ± ۰/۹۵ ^a	۷۳/۴۸ ± ۱/۱۵	۸۷/۳۹ ± ۱/۱۷
۵ mg/ml نانواکسیدروی	۶۱۸/۴۳ ± ۱/۳۸ ^a	۷۲/۱۳ ± ۱/۲۰	۸۶/۱۷ ± ۱/۰۲
P ^a value	P < 0.05	P < 0.05	P < 0.05

^a نشانگر اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل؛ (Mean±SD) (داده‌ها به‌صورت ستونی باهم مقایسه شدند).

بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه به‌منظور بررسی نقش محافظتی نانواکسیدروی بر بافت بیضه و هورمون‌های جنسی در برابر آنمی همولیتیک ناشی از

فنیل هیدرازین انجام شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که تزریق داخل صفاقی نانواکسیدروی در دوزهای پایین می‌تواند در برابر هیپوکسی ناشی از آنمی همولیتیک فنیل هیدرازین از بافت بیضه و هورمون‌های جنسی اثر محافظتی داشته باشد و سبب بهبود وضعیت آن‌ها شود. این در حالی است که در مطالعات دیگری نیز نشان داده شده است که ذرات نانو اکسیدروی بر بافت بیضه نه تنها اثرات محافظتی ندارند بلکه اثرات مضر و آسیب رسان دارند (۳۱-۲۹). در مطالعه‌ای نشان دادند که نانواکسیدروی در دوزهای mg/kg ۳۰۰ و ۵۰ می‌تواند علاوه بر اینکه اثرات آنتی‌اکسیدانی نداشته می‌تواند خود به‌عنوان یک عامل اکسیداتیو عمل کرده و سبب کاهش سطح تستوسترون و تغییرات مورفولوژیک در بافت بیضه موش‌ها گردد (۲۹)، همچنین در مطالعه‌ای دیگر طالبی و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که دوزهای بالای نانواکسیدروی (mg/kg ۳۰۰ و ۵۰) می‌تواند اثرات اکسیداتیو داشته و سبب تغییراتی در بافت بیضه همچون کاهش قطر لوله‌های سمینی‌فروس و ضخامت اپیتلیوم سمینی‌فروس شود (۳۰)، همچنین در بررسی دیگر نشان داده شده است که غلظت‌های بالای نانواکسیدروی (g/kg ۲/۵ و ۱) دارای اثرات مخرب روی تولیدمثل موش‌ها داشته و می‌تواند آسیب‌های بافتی و تغییرات هورمونی داشته باشد (۳۱). بنابراین در این مطالعه ما دوزهای پایین نانواکسیدروی را مورد مطالعه قرار دادیم و نشان دادیم که می‌تواند نانواکسیدروی در دوزهای پایین می‌تواند اثرات محافظتی داشته باشد.

یافته‌های ناشی از این مطالعه نشان داد که فنیل هیدرازین می‌تواند سبب کاهش تعداد سلول‌های سرتولی، لیدیک شده و همچنین می‌تواند سبب کاهش قطر لوله‌های منی‌ساز شود. آتروفی لوله‌های منی‌ساز و کاهش سلول‌ها، نشانه اختلال در اسپرماتوژنز است (۳۲).

در مطالعه حاضر نشان داده شد که فنیل هیدرازین می‌تواند سبب آسیب به سیستم تولیدمثلی شود، که مؤید مطالعات قبلی است. مطالعات نشان داده است که فنیل هیدرازین می‌تواند با تخریب گلبول‌های قرمز ایجاد آنمی همولیتیک نماید، و آن نیز می‌تواند از دو راه اثر خود را اعمال نماید: اول کمبود اکسیژن و دوم استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش خون. همچنین نشان داده شده است که فنیل هیدرازین علاوه بر ایجاد استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد، پراکسیداسیون چربی‌ها و تخریب اکسیداتیو اسپکترین غشای سلولی را نیز موجب خواهد شد (۱) در نتیجه این هیپوکسی ناشی از آنمی می‌تواند سبب نقص اسپرماتوژنز و آسیب‌های تولیدمثلی شود (۳۳). همچنین نشان داده شده است که استرس اکسیداتیو ناشی از آنمی همولیتیک، می‌تواند موجب آسیب به غشای سلول، پروتئین‌ها و DNA شود (۳۴). آسیب دیدن DNA

به دلیل افزایش رادیکال‌های آزاد می‌تواند سبب آپوپتوز در سلول‌های جنسی و کاهش آن‌ها می‌شود (۳۴).

در بررسی حاضر نشان داده شده است که، نانواکسیدروی احتمالاً می‌تواند بدلیل خواص خود در دوزهای پایین، سبب تعدیل رادیکال‌های آزاد ناشی از فنیل هیدرازین شود. این نتایج مؤید سایر مطالعاتی است که نشان داده‌اند نانواکسیدروی می‌تواند سبب بهبود و محافظت از سلول‌ها شود. داوی و همکاران نشان دادند که نانواکسیدروی توانایی محافظت از غشاء سلولی، افزایش میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش میزان مالون دی آلدئید را دارد (۳۵). در مطالعه‌ای دیگر نیز نشان دادند که نانواکسیدروی توانایی بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش سطح رادیکال‌های آزاد را دارد (۳۷). در مطالعه‌ای دیگر اثرات بهبودی آنتی‌اکسیدانی نانواکسیدروی را بر روی موش‌های صحرایی درمان شده با دوکسوروبیسین (doxorubicin) نشان دادند (۱۸).

در مطالعه حاضر، نشان داده شد که فنیل هیدرازین، سبب کاهش تعداد و فعالیت سلول‌های لیدیک می‌شود، که در نهایت سبب کاهش هورمون‌های جنسی می‌شود، این در حالی است که تزریق داخل صفاقی نانواکسیدروی توانست سبب محافظت از تعداد و فعالیت سلول‌های لیدیک و بهبود سطح هورمون‌های جنسی شود. این نتایج تأییدکننده نتایج دناه و مندال بود که نشان داده بودند که افزایش رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو سبب اختلالات اسپرماتوژنز شده و این افزایش، از فعالیت سلول‌های لیدیک در ترشح هورمون‌های جنسی جلوگیری می‌کند (۳۸). از طرف دیگر نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که تجویز داخل صفاقی فنیل-هیدرازین، موجب کاهش هورمون‌های LH و FSH گردید که، می‌تواند متأثر از هیپوکسی ناشی از آنمی همولیتیک باشد (۳۸)، که در گروه‌هایی که نانواکسیدروی به‌صورت داخل صفاقی تیمار شد، سطح این هورمون‌ها بهبود یافت.

در این بررسی نشان داده شد تجویز داخل صفاقی فنیل هیدرازین توانست سبب تخریب بافت بیضه، کاهش تعداد اسپرماتوسیت نوع I، ارزیابی ضریب تجمعی، اسپرماتوژنز، درصد تمایز لوله‌ای و کاهش قطر لوله‌های منی‌ساز و از هم‌گسختگی و ادماتوز لوله‌های منی‌ساز شود، که در گروه‌هایی درمانی که تجویز داخل صفاقی نانواکسیدروی به همراه فنیل هیدرازین دریافت کرده بودند، نانواکسیدروی توانست سبب محافظت از بافت بیضه شود. در مطالعه‌ای نشان داده شده است که یکی از دلایلی که می‌تواند سبب فیروزه شدن و تغییرات هیستوپاتولوژیکی بافت بیضه شود، کاهش سنتر هورمون‌ها است، چون کاهش سنتر تستوسترون خود مسئول تغییرات هیستوپاتولوژیکی بافت بیضه، کاهش قطر ضخامت لوله‌های

محافظت از اثرات نامطلوب حاصل از آنمی همولیتیک ناشی از تزریق فنیل هیدرازین در دستگاه تولید مثلی نر است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه که با تصویب و حمایت مالی طرح با عنوان "بررسی اثرات آنتی اکسیدانی نانو اکسید روی بر تنش اکسیداتیو در اثر هیپوکسی تجربی بر کیفیت اسپرم و توان باروری: مدل موش سوری" و کد ۰۱۳/د/۹۳ امکان انجام مطالعه را فراهم آوردند تشکر به عمل می آید.

زایگر می شود (۳۹)، همچنین می توان گفت که بین قطر و فعالیت اسپرماتوژنز ارتباط مستقیم وجود دارد (۴۰).

از نتایج حاصل از این مطالعه می توان نتیجه گیری کرد که داروی فنیل هیدرازین به واسطه ایجاد اختلال در دسترسی به آندروژن، باعث ایجاد تغییرات بافتی در بیضه می گردد. این مطالعه نشان داد که نانو اکسید روی در دوزهای پایین به خصوص در دوز ۲/۵ mg/kg، احتمالاً به سبب دارا بودن ویژگی های آنتی اکسیدانی قابل ملاحظه و در نتیجه مهار رادیکال های آزاد اکسیژن، قادر به

References:

- Berger J. Phenylhydrazine haematotoxicity. J Appl Biomed 2007; 5(3):125-30.
- Shukla P, Yadav NK, Poonam Singh P, Bansode FW, Singh RK. Phenylhydrazine induced toxicity: a review on its haematotoxicity. Int J Basic Appl Med Sci 2012; 2(2):86-91.
- Claro LM, Leonart MS, Comar SR, do Nascimento AJ. Effect of vitamins C and E on oxidative processes in human erythrocytes. Cell biochem funct 2006; 24(6):531-5.
- Sharma S, Halder C. Comparative effect of melatonin and vitamin E on phenylhydrazine-induced toxicity in the spleen of *Funambulus pennanti*. Environ toxicol 2009; 24(1):1-9.
- Latunde-Dada GO, Vulpe CD, Anderson GJ, Simpson RJ, McKie AT. Tissue-specific changes in iron metabolism genes in mice following phenylhydrazine-induced haemolysis. BBA-Mol Basis Dis 2004; 1690(2):169-76.
- Poggiali E, Cassinerio E, Zanaboni L, Cappellini MD. An update on iron chelation therapy. Blood Transfus 2012; 10(4):411-22.
- Tararak T. [Morphological characteristics of the pituitary-gonad system in high altitude hypoxia]. Biull Eksp Biol Med 1991; 111(4):432-6.
- Rattner BA, Macmillan BT, Michael SD, Altland PD. Plasma gonadotrophins, prolactin and corticosterone concentrations in male mice exposed to high altitude. J Reprod Fertil 1980; 60(2):431-6.
- Macome JC, Costa LE, Martin IH, Taquini AC. Steroid biosynthesis by gonads of rats submitted to chronic hypobaric hypoxia. Acta Physiol Lat Am 1976; 27(5):249-57.
- Vitzthum VJ, Wiley AS. The proximate determinants of fertility in populations exposed to chronic hypoxia. High Alt Med Biol 2003; 4(2):125-39.
- Vélez-Alavez M, De Anda-Montañez JA, Galván-Magaña F, Zenteno-Savín T. Comparative study of enzymatic antioxidants in muscle of elasmobranch and teleost fishes. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2015; 187:61-5.
- Do TD, Cozzolino D, Muhlhauser B, Box A, Able AJ. Antioxidant capacity and vitamin E in barley: effect of genotype and storage. Food chem 2015; 187:65-74.
- Klotz LO, Kröncke KD, Buchczyk DP, Sies H. Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. J Nutr 2003; 133(5):1448S-51S.
- Favier AE. The role of zinc in reproduction. Biol Trace Elem Res 1992; 32(1-3):363-82.
- Powell SR. The antioxidant properties of zinc. J Nutr 2000; 130(5):1447S-54S.
- Hernández-Sierra JF, Ruiz F, Pena DC, Martínez-Gutiérrez F, Martínez AE, Guillén AD, Tapia-Pérez H, et al. The antimicrobial sensitivity of

- Streptococcus mutans to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. *Nanomedicine: Nanotechnology. Biol Med* 2008; 4(3):237-40.
- 17- Zhao CY, Tan SX, Xiao XY, Qiu XS, Pan JQ, Tang ZX. Effects of dietary zinc oxide nanoparticles on growth performance and antioxidative status in broilers. *Biol Trace Elem Res* 2014; 160(3):361-7.
 - 18- Badkoobeh P, Parivar K, Kalantar SM, Hosseini SD, Salabat A. Effect of nano-zinc oxide on doxorubicin-induced oxidative stress and sperm disorders in adult male Wistar rats. *Iran J Reprod Med* 2013; 11(5):355.
 - 19- Negahdary M, Chelongar R, Zadeh SK, Ajdary M. The antioxidant effects of silver, gold, and zinc oxide nanoparticles on male mice in in vivo condition. *Adv Biomed Res* 2015; 4.
 - 20- Afifi M, Almaghrabi OA, Kadasa NM. Ameliorative effect of zinc oxide nanoparticles on antioxidants and sperm characteristics in streptozotocin-induced diabetic rat testes. *BioMed Res Int* 2015; 6.
 - 21- Vannucchi AM, Paoletti F, Linari S, Cellai C, Caporale R, Ferrini PR, et al. Identification and characterization of a bipotent (erythroid and megakaryocytic) cell precursor from the spleen of phenylhydrazine-treated mice. *Blood*. 2000; 95(8):2559-68.
 - 22- Jalali AS, Najafi G, Hosseini M, et al. Royal Jelly alleviates sperm toxicity and improves in vitro fertilization outcome in Stanozolol-treated mice. *Iran J Reprod Med* 2015;13(1):15.
 - 23- Loraine JA, Bell ET. Hormone assays and their clinical application. Edinburgh, UK: E. & S: Livingstone; 1971.
 - 24- Rezvanfar MA, Sadrkhanlou RA, Ahmadi A, Shojaei-Sadee H, Mohammadirad A, Salehnia A, et al. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. *Hum Exp Toxicol* 2008; 27(12):901-10.
 - 25- Kaffashi Elahi R, Mosavi Gh, Hejazi S, Khayatnori MH, Kalantari S. Tribulus Terrestris Plant Extract on Testicular Size and Histology in Rats. *Vet Med, Islam Azad Univ Tabriz* 2011; 5(1):1043-9. (Persian)
 - 26- Porter KL, Shetty G, Meistrich ML. Testicular edema is associated with spermatogonial arrest in irradiated rats. *Endocrinol* 2006; 147(3):1297-305.
 - 27- Russell LD. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press; 1990.
 - 28- Hess RA. Spermatogenesis overview, encyclopedia of reproduction. Academic press University of Illinois at Urbana 1999; (4): 534-45.
 - 29- Moridian M, Khorsandi L, Talebi AR. Morphometric and stereological assessment of the effects of zinc oxide nanoparticles on the mouse testicular tissue. *Bratislavske lekarske listy* 2014; 116(5):321-525.
 - 30- Talebi AR, Khorsandi L, Moridian M. The effect of zinc oxide nanoparticles on mouse spermatogenesis. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30(9):1203-9.
 - 31- Fatahian Dehkordi R.A, Heidarnejad S, Ameri A. ZnO Nanoparticles Effects on Male Rat Gonad Histology and Its Effect on Blood Serum Sex Factors. *J Cell Tissue (JCT)* 2015; 6(2): 187-94.
 - 32- Guneli E, Tugyan K, Ozturk H, Gumustekin M, Cilaker S, Uysal N. Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Eur Surg Res* 2008; 40(4):354-60.
 - 33- Mitra SK, Muralidhar TS, Rao DR. Experimental assessment of relative efficacy of drugs of herbal origin on sexual performance and hormone levels in alcohol exposed and normal rats. *Phytother Res* 1996; 10(4):296-9.
 - 34- Macome JC, Costa LE, Martin IH, Taquini AC. Steroid biosynthesis by gonads of rats submitted to

- chronic hypobaric hypoxia. *Acta Physiol Lat Am* 1976; 27(5):249-57.
- 35- Dawei AI, Zhisheng W, Anguo Z. Protective effects of Nano-ZnO on the primary culture mice intestinal epithelial cells in in vitro against oxidative injury. *World J Agric Sci* 2010; 6:149-53.
- 36- Sharma V, Singh P, Pandey AK, Dhawan A. Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zinc oxide nanoparticles. *Mutat Res-Gen Tox En* 2012; 745(1):84-91.
- 37- Debnath D, Mandal TK. Study of quinalphos (an environmental oestrogenic insecticide) formulation (Ekalux 25 EC)-induced damage of the testicular tissues and antioxidant defence systems in Sprague-Dawley albino rats. *J Appl Toxicol* 2000; 20(3):197-204.
- 38- Eurell, A. J. and Frappier L. B. *Dellans text book of Veterinery Histology*. 6th ed. Williams and Wilkins; 2006. P. 233-42.
- 39- Mokhtari MO, Shariatie M, Gharamanie R. Effect of *Trigonella foenum-graecum* L. seed extract on concentration of testosterone and spermatogenesis in rats. *J Med Plants Res* 2008; 1(25):12-20. (Persian)
- 40- Predes FS, Monteiro JC, Paula TA, Matta SL. Evaluation of rat testes treated with *Arctium lappa* L: Morphometric study. *Braz J Morphol Sci* 2007; 24:112-7.

PROTECTIVE EFFECT OF NANO ZINC OXIDE ON TESTIS AND SEX HORMONE LEVELS OF MICE AFTER TREATMENT WITH PHENYLHYDRAZINE

Ali Soleimanzadeh^{1*}, Abbas Ahmadi²

Received: 22 Aug, 2017; Accepted: 24 Oct, 2017

Abstract

Background & Aims: Phenylhydrazine cause adverse effect on testis tissue and hormone levels. This study was conducted to evaluate the effects of nano zinc oxide on the Testis Tissue and sex hormone levels after Phenylhydrazine-induced hypoxia in male mice.

Materials & Methods: In order to perform the study 72 adult male mice with the capability of fertilizing with the age range of 6-8weeks randomly divide to 9 groups. Group 1 (control); Group 2 (Phenylhydrazine 8 mg/100 gr/b.w/ i.p. first time and 6 mg/100 gr/b.w/ i.p. every 48 hour); Group 3 (Sham 0.1 ml/kg/ i.p.), Group 4 (Phenylhydrazine + nano zinc oxide 1 mg/kg/i.p.); Group 5 (Phenylhydrazine + nano zinc oxide 2.5 mg/kg/i.p.); Group 6 (Phenylhydrazine + nano zinc oxide 5 mg/kg/i.p.); Group 7 (nano zinc oxide 1 mg/kg/i.p.); Group 8 (nano zinc oxide 2.5 mg/kg/i.p.) and Group 9 (nano zinc oxide 5 mg/kg/i.p.). 35 days after the last treatment, they were euthanized and following analyzing the sperm features, morphologic and mophometric changes, serum level of testosterone and LH and FSH levels were also evaluated. Data were analyzed using SPSS and a value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results: The groups receiving only Phenylhydrazine showed a considerable reduction in testicles weight, spermatogenesis indicies, Tubular Differentiation Index, Spermatogenic Index and, most of the seminiferous tube laked spermatozoa and the height epithelial and number of sertoli cell and leydig cell and diameter of seminiferous tube had decreased, and the interstitial tissue increased and edmatos. However treatment with nano zinc oxide caused considerable improvement in mentioned parameters.

Conclusion: The results of this study showed that nano zinc oxide in lower dose (2.5 mg/kg) can have protective role against adverse effect caused by phenylhyrazine.

Keywords: Phenylhydrazine, Hypoxia, Nano zinc oxide, Testis, Mice

Address :Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, PO Box 1177, Urmia, West Azarbaijan, Iran.

Tel: +989144409483

Email: a.soleimanzadeh@urmia.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2017; 28(9): 571 ISSN: 1027-3727

¹ Assistant Professor, Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)

² Associate professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran