

تأثیر مصرف چای سبز (Camellia Sinensis) بر بافت بیضه رت در پی تیمار با پارانونایل فنل

محمدعلی شریعت زاده^{۱*}، ملک سلیمانی مهرنجانی^۲، سمیرا نادری نورعینی^۳

خلاصه

مقدمه: پارانونایل فنل (Para-Nonylphenol یا p-NP) می تواند از طریق کاهش فعالیت آنزیم های مهار کننده رادیکال آزاد موجب استرس اکسیداتیو شود. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تأثیر عصاره چای سبز (Green tea extract یا GTE) به عنوان یک آنتی اکسیدان در بافت بیضه رت های تیمار شده با p-NP بود.

روش: ۲۴ سر رت نژاد ویستار با میانگین وزنی 10 ± 215 گرم به ۴ گروه شش تایی تقسیم شدند. گروه اول به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد و گروه های تیمار به ترتیب p-NP (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت روزانه)، GTE (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت روزانه) و GTE + p-NP را به صورت دهانی به مدت ۵۶ روز دریافت کردند. سپس رت ها کشته و بیضه راست آن ها خارج شد. بعد از مراحل پساژ بافتی و رنگ آمیزی، حجم لوله های منی ساز و بافت بینابینی، قطر و طول لوله های منی ساز، ارتفاع اپی تلیوم زایشی، ضخامت غشای پایه و تعداد انواع سلول ها با روش های استریولوژیک محاسبه گردید. غلظت مالون دی آلدئید (MDA یا Malondialdehyde) سرم نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. داده ها با استفاده از آزمون One way ANOVA تجزیه و تحلیل گردید و $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته ها: میانگین حجم لوله های منی ساز و قطر آن ها، ضخامت غشای پایه لوله های منی ساز، ارتفاع اپی تلیوم زایشی و میانگین تعداد سلول های اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سرتولی در گروه p-NP نسبت به دیگر گروه ها به طور معنی داری کاهش یافت. غلظت MDA نیز در رت های تیمار شده با p-NP در مقایسه با گروه شاهد به طور قابل توجهی افزایش داشت.

نتیجه گیری: به نظر می رسد GTE بر سمیت ناشی از p-NP بافت بیضه نقش محافظتی دارد. بر اساس نتایج مطالعه، استفاده از چای سبز به عنوان عامل آنتی اکسیدانی می تواند اثر مهمی در پیشگیری از عوارض جانبی ناشی از در معرض قرارگیری با p-NP در مناطق صنعتی ایفا کند.

واژه های کلیدی: استریولوژی، بیضه، پارانونایل فنل، رت، عصاره هیدروالکلی چای سبز

۱- استاد بافت شناسی و جنین شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران ۲- دانشیار بافت شناسی و جنین شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران ۳- کارشناسی ارشد زیست شناسی تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: s-shariatzadeh@araku.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۴/۲۱ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۳/۹/۲۴ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۱۰/۱۰

مقدمه

می‌باشد. چهار نوع کاتچین در برگ‌های تازه چای وجود دارد که شامل «پی‌کاتچین، اپی‌گالوکاتچین، اپی‌کاتچین گالات و اپی‌گالوکاتچین گالات» است (۸). خواص آنتی‌اکسیدانی، مهار گونه‌های فعال اکسیژن و تعدیل عملکرد سلول به واسطه فلاونوئیدها، بخش بزرگی از فعالیت‌های فارماکولوژیک چای سبز را تشکیل می‌دهد (۹). اثر محافظتی GTE بر بافت بیضه در برابر سمومی همچون کادمیوم، دوکسوروبیسین و نیکوتین مانند جلوگیری از ایجاد تورم، احتقان، خونریزی و نکروز در بیضه و نیز اثر محافظتی بر لوله‌های منی‌ساز و تعداد سلول‌های زایا و نیز جلوگیری از فعالیت موتاژنیک ناشی از سموم در مطالعات اثبات شده است (۹-۱۱).

p-NP به میزان زیادی در صنعت تولید می‌شود. مشخص شده است که سموم محیطی مانند p-NP اثرات زیان‌آوری بر عملکرد سیستم تولید مثلی دارند و قادر به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که موجب استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف از جمله بیضه می‌گردد. از سوی دیگر، استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها به سرعت در حال توسعه می‌باشد. در این بین، به اثرات محافظتی آنتی‌اکسیدانی‌های با منشأ طبیعی در برابر مسمومیت‌های ناشی از عوامل شیمیایی توجه ویژه‌ای شده است (۱۲). بنابراین هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر محافظتی چای سبز بر سمیت ایجاد شده توسط p-NP بر روی بافت بیضه رت بود.

روش بررسی

۲۴ سر رت نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزنی $10 \pm$ گرم از انیستیتو پاستور ایران خریداری شد و در خانه حیوانات دانشگاه اراک و در شرایط تاریکی و روشنایی (هر کدام ۱۲ ساعت) و دمای 21 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در تمام مدت تحقیق آب و غذای فراوان

تخریب کننده‌های اندوکراین (Endocrine disruptures) یا EDs) ترکیباتی هستند که می‌توانند با هموستازی سیستم اندوکرینی (درون‌ریز) مداخله کرده، آن را تغییر دهند. EDs اثرات مخرب طولانی مدتی بر سلامت انسان، حیوانات و فرزندان آن‌ها دارد. این ترکیبات بر سیستم تیروئید، ایمنی، عصبی و متابولیسم عمومی بدن تأثیر می‌گذارند. پارانوناپل فنل (Para-Nonylphenol یا p-NP) نیز در این گروه جای می‌گیرد و قادر است عملکرد اندوکرینی بدن را تحت تأثیر قرار دهد (۱). p-NP یک ترکیب ارگانیک از خانواده بزرگ آلکیل‌فنل‌ها و محصولی است که در صنعت و طی آلکیلاسیون فنل سنتز می‌شود (۲). NP به طور وسیعی در صنعت و تهیه دترجنت‌ها، امولسیون‌ها، سورفاکتانت‌ها و در محصولات خانگی مانند رنگ‌ها، پلاستیک‌ها و لوازم آرایشی استفاده می‌شود (۳). ساختار شیمیایی p-NP یک حلقه فنلی مشابه با استرادیول دارد. اثر استروژنیک NP در تعدادی از مطالعات طبیعی بدن و آزمایشگاهی به اثبات رسیده است (۴، ۵).

NP از طریق تولید گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive oxygen species یا ROS) موجب القای استرس اکسیداتیو، افزایش سطح ROS و لیپید پراکسیداسیون و کاهش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز در بیضه رت می‌شود. این ماده بر عملکرد بیضه اثر گذاشته، موجب کاهش میزان تستوسترون گردش خون، تخریب ساختار بیضه و ممانعت از اسپرماتوژنز می‌گردد و می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های بیضه رت به ویژه سلول‌های سرتولی القا کند (۶، ۷، ۳).

چای سبز از برگ‌های گیاه *Camellia Sinensis* استخراج می‌شود و بعد از آب، متداول‌ترین آشامیدنی در جهان است که خواص سودمند ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانی دارد. عصاره چای سبز (Green tea extract یا GTE) حاوی مقادیر فراوانی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی فلاونوئید به ویژه کاتچین

موازی با یک عدد تصادفی دیگر بر روی آن زده شد. برش‌های دیگر نیز به صورت موازی و مساوی با برش اول انجام شد. سطح برش خورده قطعه دوم مماس بر محور ۰-۰ ساعت تتا (θ) قرار داشت. سپس یک عدد تصادفی انتخاب و برش‌ها به موازات عدد انتخاب شده تهیه گردید (۱۷). در نهایت ۹-۱۱ قطعه از هر بیضه به دست آمد. قطعات با حفظ جهت درون سبد فلزی قرار گرفتند و پردازش بافتی شدند. پس از تهیه قالب‌های پارافینی، از هر قالب برش‌های بافتی با ضخامت ۵ و ۲۰ میکرون تهیه گردید. برش‌های حاصل شده جهت بررسی استریولوژیک با روش Heidenhain's azan مورد رنگ‌آمیزی بافتی قرار گرفت.

محاسبه چروکیدگی بافت و حجم کل بیضه: برای محاسبه چروکیدگی، با استفاده از تروکار (Trocar) به صورت تصادفی سه قطعه گرد از برش‌های IUR مربوط به بیضه هر رت تهیه شد. سپس دو قطر عمود بر هم اندازه‌گیری و میانگین شعاع آن محاسبه گردید و به عنوان شعاع قبل از تثبیت (r Before) در نظر گرفته شد. پس از مراحل ثابت‌سازی، پاساژ بافتی، برش‌گیری و رنگ‌آمیزی، قطر قطعات دوباره مانند بالا اندازه‌گیری و میانگین شعاع به دست آمده به عنوان شعاع پس از تثبیت (r After) برآورد شد. در آخر مقدار چروکیدگی در هر بیضه با استفاده از معادله زیر مورد محاسبه قرار گرفت (۱۸). برای به دست آوردن حجم واقعی بیضه، مقدار چروکیدگی از حجم به دست آمده از روش غوطه‌ور سازی کم شد.

$$\text{Shrinkage} = 1 - \left(\frac{r_{\text{after}}}{r_{\text{before}}} \right)^2$$

محاسبه حجم لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی: به منظور محاسبه حجم لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی از میکروسکوپ Olympus DP12 مجهز به یک دوربین استفاده شد. پروب نقطه‌ای به طور تصادفی بر روی میدان‌های دیدی که به روش نمونه‌گیری تصادفی منظم (Systematic

در اختیار حیوانات قرار داشت. سپس حیوانات به طور تصادفی در ۴ گروه شش‌تایی قرار گرفتند. گروه اول به عنوان گروه شاهد استفاده شد و گروه ۲، ۳ و ۴ به ترتیب با p-NP (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت روزانه)، GTE (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت روزانه) و p-NP + GTE به صورت دهانی و مدت ۵۶ روز تیمار شدند.

با توجه به ویسکوزیته بالای p-NP (Acrose company, New Jersey, USA)، روغن ذرت به عنوان حامل (۱۳) انتخاب گردید. GTE نیز از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج تهیه و استفاده شد. در پایان دوره تیمار و بعد از توزین حیوانات، ابتدا حیوانات با استفاده از دی‌اتیل اتر بیهوش شدند و پس از تشریح، بیضه راست آنان جداسازی و وزن گردید و حجم بیضه با استفاده از روش غوطه‌ور سازی (Immersion) (۱۴) برآورد شد. سپس بافت بیضه جهت ثبوت بافتی به مدت یک هفته در فیکساتیو MDF (Modified Davidson's fluid) (۱۵) (دو بار تعویض فیکساتیو) قرار داده شد. در ضمن خونگیری از قلب حیوان پس از بیهوشی رت‌ها انجام گرفت. نمونه‌های خونی با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و سرم آن‌ها جدا گردید و تا زمان سنجش میزان مالون دی‌آلدئید (Malondialdehyde یا MDA) در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. MDA از شاخص‌های مهم لیپید پراکسیداسیون می‌باشد که میزان آن بر اساس روش Buege و Aust اندازه‌گیری گردید (۱۶).

برای تهیه برش‌های IUR (Isotropic uniform random) از تکنیک Orientation استفاده شد (۱۷) که برای انجام آن بیضه‌ها به طور تصادفی بر روی ساعتی که به ۹ قسمت مساوی تقسیم شده بود، قرار گرفت. سپس یک عدد تصادفی از ۱ تا ۹ انتخاب و بیضه در امتداد این عدد برش زده و در نتیجه دو قطعه از بیضه ایجاد شد. سطح برش خورده قطعه اول در طول محور ۰-۰ ساعت تتا (θ) که به ۹ قسمت نامساوی تقسیم شده بود، قرار گرفت و سپس برشی

دید مربوط به محاسبه طول لوله‌های منی‌ساز قرار گرفت و قطر عمود بر محور طولی حدود ۱۲۰ لوله منی‌ساز با استفاده از نرم‌افزار موتیک نسخه ۲۰۰۰ (Motic image) اندازه‌گیری گردید (۱۹).

ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی با استفاده از معادله $H = \frac{V_v}{S_v}$ محاسبه شد که در آن، V_v دانسیته حجمی اپی‌تلیوم زایشی و S_v دانسیته سطح اپی‌تلیوم زایشی می‌باشد. بدین منظور، به طور متوسط ۵ میدان دید از هر برش ۵ میکرونی بافت بیضه مربوط به هر رت با استفاده از ابژکتیو با بزرگ‌نمایی ۱۰ و روش نمونه‌گیری تصادفی منظم مورد مطالعه قرار گرفت. دانسیته حجمی اپی‌تلیوم زایشی نیز با استفاده از روش شمارش نقاط به دست آمد. معادله زیر برای محاسبه دانسیته سطح اپی‌تلیوم زایشی استفاده شد (۱۸).

$$S_v = 2 \times \frac{\sum_{i=1}^n I_i}{L/P \cdot \sum_{i=1}^n P_i}$$

در معادله فوق، $\sum I_i$ تعداد کل برخوردهای پروب خطی با سطح داخلی اپی‌تلیوم زایشی، $\sum P_i$ تعداد کل نقاط برخورد کرده با اپی‌تلیوم زایشی و L/P طول خط گردید سطح در مقیاس واقعی بافت می‌باشد.

روش اندازه‌گیری هارمونیک (Harmonic) (۲۰) برای محاسبه میانگین ضخامت غشای پایه لوله‌های منی‌ساز مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام این کار از پروبی که دارای خطوط موازی و مساوی (خطوط ایزوتروپیک) بود و همچنین ابژکتیو با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ و عکس‌های گرفته شده (حدود ۳۰ عکس) از برش‌های ۵ میکرونی به روش تصادفی منظم استفاده شد. از محل برخورد خطوط پروب با غشای داخلی غشای پایه، یک خط عمود بر خط مماس غشای خارجی کشیده شد و سپس طول این خط توسط نرم‌افزار Motic اندازه‌گیری گردید. به طور میانگین ۱۲۰

(random sampling) انتخاب شده بود، قرار گرفت. به طور میانگین، ۵ میدان دید از هر برش ۵ میکرونی بررسی و دانسیته حجمی هر یک از پارامترها با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید.

$$V_v = \frac{\sum_{i=1}^n P(x)}{\sum_{i=1}^n P_{total}}$$

در این معادله، x نقاط برخورد کرده با بافت بینایی یا لوله‌های منی‌ساز و $\sum_{i=1}^n P_{total}$ کل نقاط برخورد کرده از پروب با کل میدان دید می‌باشد. حجم کل مربوط به هر یک از اجزا به طور غیر مستقیم و به وسیله ضرب کردن دانسیته حجمی (V_v) در حجم کل بیضه هر رت تخمین زده می‌شود (۱۸).

محاسبه طول، قطر، ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی و ضخامت غشای پایه لوله‌های منی‌ساز: به منظور محاسبه طول لوله‌های منی‌ساز، از برش‌های ۵ میکرونی و ابژکتیو با بزرگ‌نمایی ۱۰ استفاده شد. فریم شمارش (Unbiased counting frame) بر روی حدود ۵ میدان دید از هر برش قرار گرفت و به طور میانگین ۱۲۰ لوله منی‌ساز در بیضه هر رت شمارش گردید. دانسیته طولی لوله‌های منی‌ساز نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۷، ۱۸).

$$L_v = 2 \times \frac{\sum_{i=1}^n Q_i}{a/f \cdot \sum_{i=1}^n P_i}$$

در معادله فوق، $\sum Q_i$ مجموع لوله‌های انتخاب شده، a/f سطح فریم مورد نظر در مقیاس بافت (۲۲۰۰ میکرومتر) و $\sum P_i$ مجموع نقاط برخورد کرده با بافت بیضه است. برای به دست آوردن طول کل لوله‌های منی‌ساز، دانسیته طولی (L_v) در حجم نهایی بیضه ضرب شد (۱۸).

برای محاسبه میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز، فریم مخصوص شمارش بر روی عکس‌های مربوط به میدان‌های

میدان‌های دید انتخابی، h ارتفاعی از برش که در آن شمارش صورت می‌گیرد (۱۰ میکرومتر) و a/f سطح فریم در مقیاس واقعی بافت (۴۶۰ میکرومتر) می‌باشد. برای محاسبه تعداد کل انواع سلول‌های مورد نظر، عدد حاصل در حجم کل بیضه مربوط ضرب شد.

$$N (\text{Total}) = NV \times V (\text{Total testis})$$

در نهایت، داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون‌های One way ANOVA و Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

حجم کل بیضه، لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی (میلی‌متر مکعب)

میانگین حجم کل بیضه رت‌ها در گروه p-NP نسبت به دو گروه GTE + p-NP و GTE اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P < 0/05$). در گروه p-NP میانگین حجم لوله‌های منی‌ساز نسبت به سایر گروه‌ها کاهش معنی‌دار ($P < 0/01$) و میانگین حجم بافت بینابینی افزایش معنی‌داری ($P < 0/01$) داشت. این تغییر حجم در گروه GTE + p-NP به طور معنی‌دار و در حد گروه شاهد جبران شد ($P < 0/01$) (جدول ۱).

برخورد (Intercept) به دست آمد و میانگین ضخامت غشای پایه با استفاده از معادله زیر محاسبه شد.

Harmonic mean of orthogonal intercepts = $\sqrt[3]{\text{Harmonic mean layer thickness}}$

که در آن

Harmonic mean = number of measurements / sum of the reciprocal of orthogonal intercepts (o_i) Length = number of measurements / $(\frac{1}{o_{i1}} + \frac{1}{o_{i2}} + \frac{1}{o_{i3}} + \frac{1}{o_{i4}} + \dots)$

برای محاسبه تعداد انواع سلول‌ها از روش Optical disector و از فریم مخصوص شمارش استفاده شد (۱۸). برای این کار با استفاده از ابژکتیو با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ و استفاده از روش تصادفی منظم، از همه برش‌های ۲۰ میکرونی بیضه هر رت تعدادی میدان دید برای شمارش انواع سلول‌ها انتخاب گردید و برای شمارش، میکروکیتور (ND 221 B, Heidenhain, Germany) مورد استفاده قرار گرفت. به طور میانگین، ۱۵۰-۱۳۰ سلول در هر رت شمارش و دانسیته عددی (Nv) انواع سلول‌ها از فرمول زیر محاسبه شد.

$$Nv = \frac{\sum_{i=1}^n Q_i}{h \cdot \sum_{i=1}^n P_i \cdot \frac{a}{f}}$$

در فرمول فوق، $\sum Q_i$ تعداد کل انواع سلول‌های شمارش شده، $\sum P_i$ مجموع نقاط برخورد کرده با

جدول ۱. مقایسه میانگین حجم کل بیضه، لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی در گروه‌های مختلف رت ۵۶ روز پس از تیمار

گروه‌ها	حجم کل بیضه (میلی‌متر مکعب)	حجم لوله‌های منی‌ساز (میلی‌متر مکعب)	حجم بافت بینابینی (میلی‌متر مکعب)
شاهد	میانگین \pm انحراف معیار *** $1036/02 \pm 58/88$	میانگین \pm انحراف معیار * $791/29 \pm 52/29$	میانگین \pm انحراف معیار * $244/73 \pm 15/39$
p-NP	*** $998/20 \pm 20/54$	* $701/78 \pm 23/95$	** $293/42 \pm 10/60$
GTE + p-NP	* $1058/91 \pm 33/45$	* $811/33 \pm 36/90$	* $247/57 \pm 27/84$
GTE	* $1078/91 \pm 24/90$	* $839/10 \pm 35/82$	* $239/80 \pm 28/52$

p-NP: Para-Nonylphenol; GTE: Green tea extract

طول (متر)، قطر، ارتفاع اپی تلیوم زایشی و ضخامت غشای پایه لوله‌های منی‌ساز (میکرومتر) میانگین طول لوله‌های منی‌ساز در گروه p-NP نسبت به گروه شاهد کاهش داشت، اما این کاهش معنی‌دار نبود ($P > 0/050$)؛ در حالی که کاهش معنی‌داری در میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز ($P < 0/002$)، ارتفاع اپی تلیوم زایشی ($P < 0/010$) و همچنین میانگین ضخامت غشای پایه

لوله‌های منی‌ساز ($P < 0/001$) در گروه p-NP در مقایسه با سایر گروه‌ها مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که GTE توانسته است طول، قطر، ارتفاع اپی تلیوم زایشی و ضخامت غشای پایه لوله‌های منی‌ساز را در گروه p-NP + GTE در حد گروه شاهد بهبود دهد (جدول ۲).

جدول ۲. مقایسه میانگین طول، قطر، ضخامت غشای پایه و ارتفاع اپی تلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز در گروه‌های مختلف رت ۵۶ روز پس از

تیمار

گروه‌ها	طول لوله‌های منی‌ساز (متر)	قطر لوله‌های منی‌ساز (میکرومتر)	ضخامت غشای پایه لوله‌های منی‌ساز (میکرومتر)	ارتفاع اپی تلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز (میکرومتر)
شاهد	میانگین \pm انحراف معیار * $17/67 \pm 1/59$	میانگین \pm انحراف معیار * $265/61 \pm 18/97$	میانگین \pm انحراف معیار * $8/27 \pm 0/07$	میانگین \pm انحراف معیار * $76/05 \pm 2/90$
p-NP	میانگین \pm انحراف معیار * $15/56 \pm 1/18$	میانگین \pm انحراف معیار * $239/43 \pm 15/72$	میانگین \pm انحراف معیار * $7/39 \pm 0/29$	میانگین \pm انحراف معیار * $68/69 \pm 3/98$
GTE + p-NP	میانگین \pm انحراف معیار * $17/20 \pm 1/85$	میانگین \pm انحراف معیار * $266/18 \pm 5/17$	میانگین \pm انحراف معیار * $8/10 \pm 0/17$	میانگین \pm انحراف معیار * $78/84 \pm 3/34$
GTE	میانگین \pm انحراف معیار * $18/08 \pm 2/67$	میانگین \pm انحراف معیار * $271/59 \pm 4/29$	میانگین \pm انحراف معیار * $8/34 \pm 0/09$	میانگین \pm انحراف معیار * $79/31 \pm 4/91$

p-NP: Para-Nonylphenol; GTE: Green tea extract

تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی (نوع A و B)، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سرتولی میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A و B در بین چهار گروه تغییر معنی‌داری نداشت ($P > 0/050$). در گروه p-NP کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت ($P < 0/002$)، اسپرماتید ($P < 0/010$) و سرتولی ($P < 0/050$) نسبت به دیگر گروه‌ها مشاهده

گردید. تیمار با GTE در گروه p-NP + GTE سبب افزایش معنی‌دار تعداد این سلول‌ها نسبت به گروه دریافت‌کننده p-NP شد ($P < 0/050$). همچنین میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروهی که تنها GTE دریافت کرده بودند، نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/010$) (جدول ۳).

جدول ۳. مقایسه میانگین تعداد انواع سلول‌های اسپرماتوگونی (نوع A و B)، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سرتولی ($\times 10^6$) در گروه‌های مختلف رت ۵۶ روز پس از تیمار

گروه‌ها	تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A	تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی نوع B	تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت	تعداد سلول‌های اسپرماتید	تعداد سلول‌های سرتولی
	میانگین \pm انحراف معیار	میانگین \pm انحراف معیار	میانگین \pm انحراف معیار	میانگین \pm انحراف معیار	میانگین \pm انحراف معیار
شاهد	$8/80 \pm 0/6$	$1/95 \pm 0/2$	$140 \pm 9/0$	$327 \pm 21/0$	$30 \pm 3/0$
p-NP	$8/57 \pm 0/5$	$1/77 \pm 0/2$	$110 \pm 19/0$	$280 \pm 19/0$	$24 \pm 2/0$
GTE + p-NP	$8/68 \pm 0/9$	$1/93 \pm 0/2$	$139 \pm 8/0$	$322 \pm 22/0$	$28 \pm 1/0$
GTE	$9/70 \pm 1/2$	$2/05 \pm 0/2$	$144 \pm 9/0$	$377 \pm 26/0$	$32 \pm 3/0$

p-NP: Para-Nonylphenol; GTE: Green tea extract

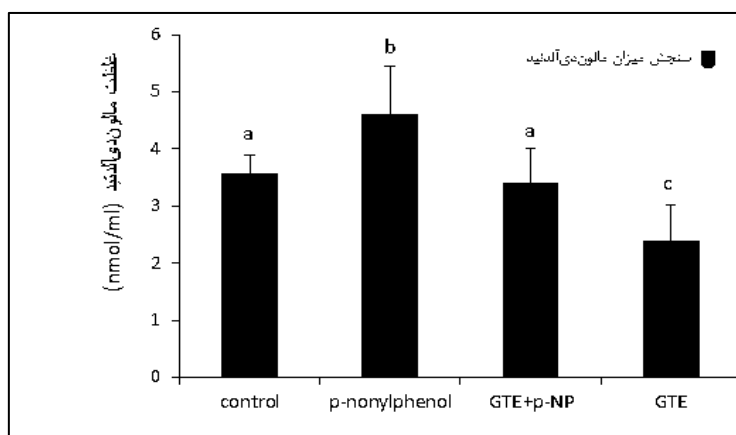
وزن بدن و بیضه
میانگین وزن اولیه رت و وزن رت پس از اتمام دوره تیمار اختلاف معنی‌داری را در بین گروه‌های مختلف نشان نداد ($P > 0/05$)، اما میانگین وزن بیضه پس از اتمام دوره تیمار در گروه p-NP نسبت به دو گروه GTE + p-NP و GTE کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0/05$) (جدول ۴).

جدول ۴. مقایسه میانگین وزن رت و وزن بیضه در گروه‌های مختلف رت ۵۶ روز پس از تیمار

گروه‌ها	وزن اولیه رت (گرم)	وزن رت در پایان تیمار (گرم)	وزن بیضه رت (گرم)
	میانگین \pm انحراف معیار	میانگین \pm انحراف معیار	میانگین \pm انحراف معیار
شاهد	$217/50 \pm 7/34$	$294/83 \pm 15/51$	$1/38 \pm 0/14$
p-NP	$215/33 \pm 10/83$	$259/17 \pm 23/32$	$1/29 \pm 0/10$
GTE + p-NP	$214/33 \pm 3/33$	$277/50 \pm 28/15$	$1/44 \pm 0/03$
GTE	$213/33 \pm 15/00$	$283/50 \pm 24/39$	$1/47 \pm 0/06$

p-NP: Para-Nonylphenol; GTE: Green tea extract

مقایسه غلظت MDA در بین گروه‌ها
سطح MDA سرم به عنوان مارکر لیپید پراکسیداسیون در گروه p-NP نسبت به گروه شاهد افزایش قابل توجهی نشان داد ($P < 0/05$) و در مقابل، کاهش معنی‌داری در میزان MDA در گروه p-NP + GTE نسبت به گروه p-NP مشاهده شد ($P < 0/02$)؛ در حالی که غلظت MDA سرم در گروه GTE نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0/02$) (شکل ۱).



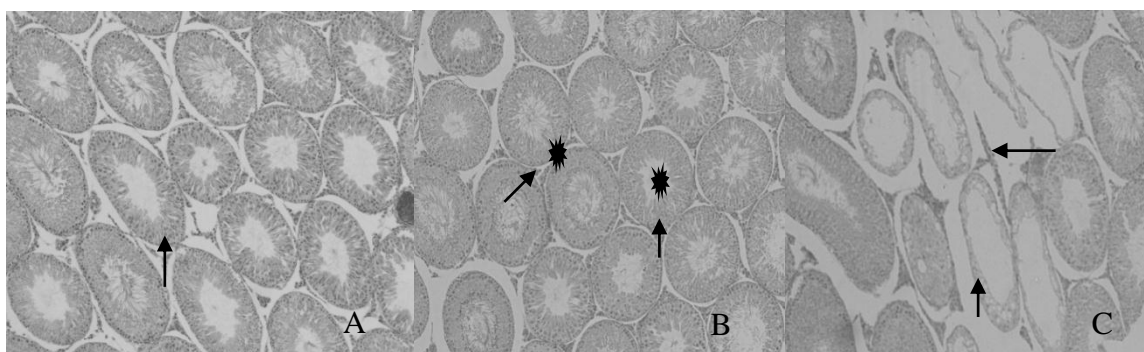
شکل ۱. میزان MDA (Malondialdehyde) (نانومول بر میلی متر) در گروه‌های مختلف رت ۵۶ روز پس از تیمار هر ستون نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار می‌باشد.

p-NP: Para-Nonylphenol; GTE: Green tea extract

ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی کاهش یافت. همچنین کاهش در تراکم اسپرم‌ها در لومن لوله‌های منی‌ساز و آثاری از واکوئل‌زایی در اپی‌تلیوم بعضی از لوله‌ها وجود داشت (شکل ۲، قسمت B). در گروه دریافت کننده $GTE \pm p-NP$ ، نمای بافت‌شناسی بیضه تا حدودی شبیه نمونه طبیعی بود (شکل ۲، قسمت C).

بررسی‌های هیستوپاتولوژیک

مطالعات هیستوپاتولوژیک نشان داد که بافت بیضه در گروه شاهد و گروه GTE طبیعی بود و اپی‌تلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز ترتیب و نظم سلولی طبیعی داشت (شکل ۲، قسمت A)، اما افزایش وسعت بافت بینابینی به همراه تخریب وسیع لوله‌های منی‌ساز در بیضه رت‌های گروه p-NP مشاهده شد. وسعت لومن در گروه p-NP افزایش و



شکل ۲. نمای میکروسکوپی از بافت بیضه رت‌های گروه شاهد (A)، p-NP (B) و $GTE + p-NP$ (C) (رنگ آمیزی Heidenhain's azan و بزرگ‌نمایی ۱۰۰×)

ساختار بافت طبیعی به همراه آرایش طبیعی اپی‌تلیوم زایشی در گروه شاهد و گروه $GTE + p-NP$ (A و C) (پیکان)، افزایش وسعت بافت بینابینی (علامت ستاره)، آتروفی و تخریب لوله‌های منی‌ساز، کاهش ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی به همراه واکوئل شدن اپی‌تلیوم (نوک پیکان) در گروه تیمار شده با p-NP (B)

بحث

در مطالعه حاضر اثر GTE در کاهش مسمومیت ناشی از p-NP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تیمار رت‌های بالغ با p-NP به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۵۶ روز منجر به افزایش معنی‌دار حجم بافت بینابینی و کاهش معنی‌دار حجم لوله‌های منی‌ساز، کاهش قطر، ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی، ضخامت غشای پایه لوله‌های منی‌ساز و تعداد سلول‌های سرتولی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید می‌شود. همچنین نتایج حاکی از آن بود که در پایان دوره تیمار، در وزن بدن و بیضه حیوانات گروه p-NP نسبت به گروه شاهد کاهشی صورت نگرفته است. میزان MDA سرم نیز در گروه p-NP نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت. این یافته‌ها با نتایج مطالعات پیشین (۲۱، ۱۳، ۷) همخوانی دارد.

تیمار با NP موجب افزایش سطح ROS و لیپید پراکسیداسیون و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز در بیضه رت می‌شود (۷). تحقیقی نشان داد که غلظت‌های میکرومولار از NP باعث القای استرس اکسیداتیو و سیتوتوکسیسیته در شرایط آزمایشگاهی می‌گردد (۶). در پژوهش حاضر نیز سطح MDA - که محصول نهایی لیپید پراکسیداسیون است - در سرم رت‌های تیمار شده با p-NP افزایش معنی‌داری در مقایسه با سایر گروه‌ها داشت. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که افزایش غلظت MDA ناشی از لیپید پراکسیداسیون منجر به آسیب اکسیداتیو سلولی می‌شود (۲۲) و آسیب اکسیداتیو خود می‌تواند منجر به مرگ سلول‌های جنسی و اختلال در اسپرماتوژنز گردد (۲۳). بنابراین کاهش قطر و ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی و همچنین تعداد سلول‌های جنسی در مطالعه حاضر را می‌توان تا حدی ناشی از اثر استرس اکسیداتیوی NP دانست. بر اساس نتایج مطالعه‌ای، دوزهای ۱۰۰، ۲۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم

بر کیلوگرم از NP بر روی رت‌های بالغ، موجب کاهش قطر و ضخامت اپی‌تلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز می‌شود (۲۱) که با نتایج مطالعه حاضر هم‌راستا است.

از سوی دیگر، NP با آسیب زدن به اتصالات منفذدار (Gap junction) بین سلول‌های سرتولی می‌تواند باعث عدم ثبات غشای سلول‌های سرتولی و در نتیجه آسیب به اتصالات این سلول‌ها با سلول‌های جنسی شود که این امر خود باعث از بین رفتن اسپرماتوسیت‌ها، اسپرماتیدها و آزادسازی نا به هنگام اسپرماتوزوآ به لومن خواهد شد (۲۵، ۲۴). با از بین رفتن این سلول‌های جنسی می‌توان کاهش ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی و نیز آتروفی لوله‌های منی‌ساز را انتظار داشت.

p-NP در مطالعه حاضر تعداد سلول‌های سرتولی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید را تغییر داد، اما در تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی A و B تغییری ایجاد نکرد. مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های اسپرماتوگونی در مقایسه با سلول‌های جنسی مقاوم‌تر هستند (۲۶). همچنین مشاهده شده است تیمار با NP منجر به هایپرتروفی سلول‌های سرتولی و افزایش سطح ROS داخل سلولی و مارکرهای (شاخص‌های) لیپید پراکسیداسیون می‌شود که ممکن است نقش مهمی در القای آپوپتوز این سلول‌ها داشته باشد (۱). مطالعه‌ای بیان کرد که NP از طریق ممانعت از فعالیت پمپ Ca^{2+} در شبکه آندوپلاسمی، باعث القای آپوپتوز در سلول‌های بیضه رت به ویژه سلول‌های سرتولی می‌گردد (۲۷). سلول‌های سرتولی سلول‌های سوماتیکی هستند که یک تکیه‌گاه فیزیکی را برای سلول‌های جنسی فراهم نموده، عوامل رشد هورمون‌ها و سیگنال‌ها را به درون لوله‌های منی‌ساز (یعنی جایی که اسپرماتوژنز رخ می‌دهد) هدایت می‌کنند. بنابراین هر گونه تغییر در سلول‌های سرتولی می‌تواند منجر به آسیب اسپرماتوژنز و اسپرمیوژنز گردد (۱). در نهایت آسیب سلول‌های سرتولی - که یکی

بهبود یابد. برگشت تغییرات به وسیله GTE با نتایج تحقیقات زیادی (۹-۱۱) مطابقت دارد. میزان MDA سرم نیز در رت‌های گروه p-NP + GTE نسبت به رت‌های تیمار شده با p-NP کاهش معنی‌داری داشت. حتی این میزان در حیواناتی که تنها GTE دریافت کرده بودند، نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد. اثر مهارى GTE در برابر سمیت ناشی از دوکسورویسین بر بافت بیضه در پژوهش Patil و Balaraman نشان داده شد. در پژوهش آنان، GTE به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ازای وزن بدن توانست موجب بهبود وزن بدن، تعداد اسپرم، میزان تستوسترون، کاهش لیپید پراکسیداسیون و تغییرات هیستوپاتولوژیک بیضه (مانند آتروفی و افزایش وسعت بافت بینابینی) و نیز افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شود (۱۱). پژوهش‌های دیگری که بر روی موش و رت‌های تیمار شده با سمومی با توان القای استرس اکسیداتیو مانند نیکوتین (۹) و کادمیوم (۱۰) انجام گرفته نیز نتایجی مشابه تحقیق Patil و Balaraman (۱۱) ارایه کرده‌اند.

مکانیسم محافظتی چای سبز ممکن است به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن باشد (۱۲). کاتچین‌های چای سبز ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی اورات، بتاکاروتن، ویتامین C و ویتامین E را در محافظت از سلول دارا هستند (۳۰)، علاوه بر آن، تجویز GTE باعث افزایش غلظت گلوکاتیون می‌شود (۱۲). بنابراین ممکن است چای سبز با افزایش ذخایر گلوکاتیون در بیضه، باعث حذف متابولیت‌های سمی NP گردد. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که کاتچین‌ها توانایی مهار سوپراکسیدها و رادیکال‌های هیدروکسیل را دارند که این امر قابلیت چای سبز را در ممانعت از تشکیل رادیکال‌های آزاد و ایجاد اکسیداسیون اثبات می‌کند (۱۲)، (۸). نتایج مطالعه حاضر نیز کاهش سطح MDA و در نهایت لیپید پراکسیداسیون را در سرم رت‌های تیمار شده با GTE + p-NP در مقایسه با گروه p-NP نشان داد.

از اهداف مسمومیت با p-NP به شمار می‌رود- سبب آسیب و آپوپتوز سلول‌های جنسی و در نتیجه کاهش تعداد آن‌ها خواهد شد. سایر مطالعات نیز گزارش کرده‌اند که NP منجر به القای استرس اکسیداتیو در سلول‌های سرتولی و در نتیجه آپوپتوز این سلول‌ها و همچنین آپوپتوز سلول‌های جنسی می‌شود (۲۷، ۱۳، ۶).

NP بر بیوستنز تستوسترون تأثیر دارد و موجب کاهش میزان آن در دوزهای بالا می‌شود (۳). با کاهش تستوسترون، فرایند اسپرماتوژنز و میزان تکثیر سلولی هم که وابسته به این هورمون است، دچار اختلال می‌گردد (۲۸). به این ترتیب لوله‌های منی‌ساز بخش بزرگی از جمعیت سلولی خود را از دست می‌دهد و کاهش سلول‌های جنسی و در نتیجه کاهش ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی در لوله‌های منی‌ساز مشاهده خواهد شد.

در مطالعه حاضر، p-NP سبب افزایش معنی‌دار حجم بافت بینابینی و کاهش معنی‌دار حجم لوله‌های منی‌ساز شد. اثر p-NP بر روی بافت بیضه رت‌های نر بالغ توسط Shalaby و Saleh نیز مورد مطالعه قرار گرفت. در مطالعه آنان تیمار با دوز روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از NP برای ۶ هفته، موجب آتروفی لوله‌های منی‌ساز و همچنین افزایش وسعت فضای بینابینی به همراه ادم در این بافت شد (۷). یکی از دلایل گشادشدگی رگ‌ها و در نهایت ادم توسط p-NP را می‌توان عملکرد آن در ممانعت از نفوذ Ca^{2+} به واسطه کانال‌های کلسیمی نوع L در سلول‌های ماهیچه‌ای صاف رگ‌ها دانست (۲۹) که این ادم ایجاد شده در بافت بینابینی موجب افزایش وسعت بافت بینابینی در بیضه می‌شود.

در مطالعه حاضر GTE در گروه p-NP + GTE باعث شد که افزایش در حجم بافت بینابینی و کاهش در حجم لوله‌های منی‌ساز، قطر، ضخامت غشای پایه و ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز و همچنین تعداد سلول‌های سرتولی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید در حد گروه شاهد

بیضه و GTE نیز به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانتی خود (۱۲)، سبب از بین رفتن رادیکال‌های آزاد ناشی از p-NP و در نهایت کاهش سمیت p-NP بر بافت بیضه رت می‌شود.

سپاسگزاری

مقاله حاضر حاصل طرح تحقیقاتی (شماره ۹۲/۴۶۲۵ تاریخ ۱۳۹۲/۷/۱) بود. بدین‌وسیله از معاونت محترم شورای پژوهشی دانشگاه و همچنین پژوهشکده گیاهان دارویی کرج به منظور تهیه عصاره چای سبز و همکاری در اجرای طرح، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

مطالعات پیشین اثر ضد آپوپتوزی چای سبز را نیز اثبات کرده‌اند (۳۱). همچنین گزارش شده است که اپی‌گالوکاتچین گالات (Epigallocatechin gallate یا EGCG) موجود در چای سبز از طریق اثر بر تقسیم سلولی و اثر ضد آپوپتوزی، موجب تکثیر، تقسیم و تحریک رشد سلول‌های طبیعی می‌شود (۳۲)، پس این احتمال وجود دارد که چای سبز با کاهش یا مهار آپوپتوز نیز باعث کاهش مرگ سلولی ناشی از p-NP شده باشد.

با توجه به یافته‌های به دست آمده، می‌توان برداشت کرد که p-NP با سوق دادن شرایط فیزیولوژیک به سمت استرس اکسیداتیو (۷، ۱)، باعث آسیب رساندن به بافت

oxidative stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2010; 152(2): 175-81.

References

1. Lukáčová J, Knažická Z, Tvrdá E, Lukác N, Massanyi P. The toxic effect of 4-nonylphenol on male reproductive system. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2013; 2: 1455-68.
2. Kim YS, Katase T, Makino M, Uchiyama T, Fujimoto Y, Inoue T, et al. Separation, structural elucidation and estrogenic activity studies of the structural isomers of 4-nonylphenol by GC-PFC coupled with MS and NMR. *Australasian Journal of Ecotoxicology* 2005; 11: 137-48.
3. Gong Y, Han XD. Effect of nonylphenol on steroidogenesis of rat Leydig cells. *J Environ Sci Health B* 2006; 41(5): 705-15.
4. Riva C, Porte C, Binelli A, Provini A. Evaluation of 4-nonylphenol in vivo exposure in *Dreissena polymorpha*: Bioaccumulation, steroid levels and
5. Verner MA, Magher T, Haddad S. High concentrations of commonly used drugs can inhibit the in vitro glucuronidation of bisphenol A and nonylphenol in rats. *Xenobiotica* 2010; 40(2): 83-92.
6. Gong Y, Han XD. Nonylphenol-induced oxidative stress and cytotoxicity in testicular Sertoli cells. *Reproductive Toxicology* 2006; 22(4): 623-30.
7. Shalaby K, Saleh E. Ameliorative Effect of Honey Bee Propolis on the Nonylphenol Induced- Reproductive Toxicity in Male Albino Rats. *Journal of Applied Sciences Research* 2011; 7(11): 918.
8. Sutherland BA, Rahman RM, Appleton I. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-

- induced neurodegeneration. *J Nutr Biochem* 2006; 17(5): 291-306.
9. Gawish AM, Ramadan S, Hassan AM, Issa AM. Morphometrical, histopathological, and cytogenetical ameliorating effects of green tea extract on nicotine toxicity of the testis of rats. *J Cytol Histol* 2010; 1: 105.
 10. El-Shahat AE, Gabr A, Meki AR, Mehana ES. Altered testicular morphology and oxidative stress induced by cadmium in experimental rats and protective effect of simultaneous green tea extract. *Int J Morphol* 2009; 27(3): 757-64.
 11. Patil LJ, Balaraman R. Green tea extract protects doxorubicin induced testicular damage in rats. *Pharmacologyonline* 2008; 3: 913-25.
 12. Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr* 2003; 133(10): 3275S-84S.
 13. Han XD, Tu ZG, Gong Y, Shen SU, Wang XY, Kang LN, et al. The toxic effects of nonylphenol on the reproductive system of male rats. *Reproductive Toxicology* 2004; 19(2): 215-21.
 14. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003; 75(4): 469-86.
 15. 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.
 16. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-10.
 17. Mouton PR. Length and surface area. In: Mouton PR, Editor. Principles and practices of unbiased stereology: an introduction for bioscientists. Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press, 2002. p. 103-5.
 18. Mehranjani MS, Noorafshan A, Momeni HR, Abnosi MH, Mahmoodi M, Anvari M, et al. Stereological study of the effects of vitamin E on testis structure in rats treated with para-nonylphenol. *Asian J Androl* 2009; 11(4): 508-16.
 19. Dalgaard M, Pilegaard K, Ladefoged O. In utero exposure to diethylstilboestrol or 4-n-nonylphenol in rats: number of sertoli cells, diameter and length of seminiferous tubules estimated by stereological methods. *Pharmacol Toxicol* 2002; 90(2): 59-65.
 20. Ferrando RE, Nyengaard JR, Hays SR, Fahy JV, Woodruff PG. Applying stereology to measure thickness of the basement membrane zone in bronchial biopsy specimens. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112(6): 1243-5.
 21. de JC, Bornman MS, van der Horst G. The effect of p-nonylphenol, an environmental toxicant with oestrogenic properties, on fertility potential in adult male rats. *Andrologia* 1999; 31(2): 99-106.
 22. Vidyasagar J, Karunakar N, Reddy MS, Rajnarayana K, Surender T, Krishna DR. Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorous insecticide

- poisoning. *Indian J Pharmacol* 2004; 36(2): 76-9.
23. Mathur PP, Huang L, Kashou A, Vaithinathan S, Agarwal A. Environmental Toxicants and Testicular Apoptosis. *The Open Reproductive Science Journal* 2011; 3: 114-24.
 24. Varghese AC, du Plessis SS, Agarwal A. Male gamete survival at stake: causes and solutions. *Reprod Biomed Online* 2008; 17(6): 866-80.
 25. Jedlinska-Krakowska M, Bomba G, Jakubowski K, Rotkiewicz T, Jana B, Penkowski A. Impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testes morphology in rats. *J Reprod Dev* 2006; 52(2): 203-9.
 26. Aydos K, Guven MC, Can B, Ergun A. Nicotine toxicity to the ultrastructure of the testis in rats. *BJU Int* 2001; 88(6): 622-6.
 27. Hughes PJ, McLellan H, Lowes DA, Kahn SZ, Bilmen JG, Tovey SC, et al. Estrogenic alkylphenols induce cell death by inhibiting testis endoplasmic reticulum Ca(2+) pumps. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277(3): 568-74.
 28. McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K, et al. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 149-79.
 29. Ruehlmann DO, Steinert JR, Valverde MA, Jacob R, Mann GE. Environmental estrogenic pollutants induce acute vascular relaxation by inhibiting L-type Ca²⁺ channels in smooth muscle cells. *FASEB J* 1998; 12(7): 613-9.
 30. Pietta PG, Simonetti P, Gardana C, Brusamolino A, Morazzoni P, Bombardelli E. Catechin metabolites after intake of green tea infusions. *Biofactors* 1998; 8(1-2): 111-8.
 31. Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res* 2006; 66(5): 2500-5.
 32. Nie S, Xie M, Fu Z, Wan Y, Yan A. Study on the purification and chemical compositions of tea glycoprotein. *Carbohydrate Polymers* 2008; 71(4): 626-33.

The Effect of Green Tea (*Camellia Sinensis*) on Rat Testicular Tissue Following Exposure to Para-Nonylphenol

Mohammad Ali Shariatzadeh, Ph.D.^{1*}, Malek Soleimani-Mehranjani, Ph.D.², Samira Naderi-Noreini, M.Sc.³

1. Professor of Histology & Embryology, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

2. Associate Professor of Histology & Embryology, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

3. Master of Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

* Corresponding author; e-mail: s-shariatzadeh@araku.ac.ir

(Received: 12 July 2014 Accepted: 31 Dec. 2014)

Abstract

Background & Aims: Para-Nonylphenol (p-NP) can cause oxidative stress through reducing the activity of scavenging enzymes. The aim of the present study was to investigate the effect of green tea extract, as an antioxidant, on testis in rats exposed to p-NP.

Methods: In the present study, 24 Wistar rats with mean body weight of 215 ± 10 g were divided into 4 groups (n = 6). The first group was considered as the control group. The treatment group, respectively, received p-NP (200 mg/kg/day), green tea extract (200 mg/kg/day), and p-NP + green tea extract orally for 56 days. Then, the rats were sacrificed and their right testis removed. After tissue processing and staining, the volume of seminiferous tubules and interstitial tissue, seminiferous tubules length and diameter, height of germinal epithelium, basement membrane thickness, and the number of cell types were estimated stereologically. The concentration of serum malondialdehyde (MDA) was also evaluated. Data were analyzed using one-way ANOVA. All P values of less than 0.05 were considered significant.

Results: The mean volume and diameter of seminiferous tubules, the thickness of their basement membrane, germinal epithelium height, and mean total number of spermatocytes, spermatids, and Sertoli cells significantly reduced in the p-NP group compared to other groups. MDA concentration in rats treated with p-NP significantly increased compared with the control group.

Conclusion: Green tea seems to have a protective role in p-NP-induced toxicity in testis tissue. Thus, the results suggest that consumption of green tea, as an antioxidant agent, can play an important role in preventing the side effects of p-NP exposure in industrial areas.

Keywords: Green tea hydroalcoholic extract, Para-Nonylphenol, Rat, Stereology, Testis