ارزیابی اسپرم موش‌های سوری مبتلا به آنمی همولیتیک القاء شده توسط فنیل هیدرازین و اثر محافظتی کروسین

علی کلانتری‌حصاری[۱*]، رسول شهروز[۲]، عباس احمدی[۲] و حسن ملکی‌نژاد[۲]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۹

چکیده

کم‌خونی همولتیک و به تبع آن کاهش اکسیژن‌رسانی می‌تواند موجب اختلال در عملکرد بیضه و اسپرماتوژنز گردد. هم‌چنین آهن آزاد شده از گلبول‌های قرمز و به دنبال آن افزایش آهن بافتی ممکن است ایجاد استرس اکسیداتیو نماید. هدف از این مطالعه، بررسی اثر آنمی‌همولیتیک ایجاد شده توسط فنیل‌هیدرازین بر کیفیت اسپرم موش سوری و نقش محافظتی کروسین بر آسیب ناشی از فنیل-هیدرازین بود. از این رو در تحقیق حاضر، تعداد ۴۹ قطعه موش سوری نر بالغ ۲۰ تا ۲۵ گرمی در ۷ گروه مورد استفاده قرار گرفتند. گروه اول کنترل، دریافت‌کننده‌ی سرم فیزیولوژی و سه گروه دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین با دوزهای ۲، ۴ و ۶ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی هر ۴۸ ساعت یک بار و سه گروه دیگر همراه فنیل‌هیدرازین‌کروسین با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن هر ۲۴ ساعت یک بار به مدت ۳۵ روز به روش داخل صفاقی دریافت نمودند. بعد از اتمام دوره‌ی درمان، نمونه‌های اسپرم گرفته شده از دم اپیدیدیم پس از شمارش کلی و بررسی میزان تحرک، از نظر میزان زنده بودن، بلوغ هسته و آسیب DNA مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان‌دهنده‌ی کاهش چشم‌گیر و وابسته به دوز تعداد اسپرم، میزان تحرک، درصد زنده بودن، درصد بلوغ هسته‌ای و اسپرم‌های با DNA سالم در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین بود. نتایج حاصل بیانگر این است که کم خونی همولیتیک ناشی از فنیل هیدرازین، به طور معنی‌دار کیفیت اسپرم‌ها را کاهش داده است، در حالی که بررسی گروه‌های دریافت‌کننده‌ی کروسین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت نشان‌دهنده‌ی به حداقل رسیدن این آسیب‌ها بود ($P<۰/۰۵$). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که کروسین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قادر به خنثی نمودن عوارض ناشی از آنمی همولیتیک در مورد کیفیت اسپرم است.

کلمات کلیدی: آنمی همولیتیک، هیپوکسی، آهن بافتی، فنیل هیدرازین، کروسین، کیفیت اسپرم

مقدمه

قرار گرفتن در معرض بسیاری از عوامل شیمیایی صنعتی مانند برخی سموم تجاری یا استفاده‌ی نادرست از برخی داروها و یا برخی عوامل طبیعی مانند سم حیوانات یا برخی انگل‌ها، منجر به ایجاد همولیز در گلبول‌های قرمز و ایجاد آنمی همولیتیک می‌شود. یکی از مشخص‌ترین عوارض ناشی از این نوع کم‌خونی را می‌توان افزایش میزان آهن بافتی در اثر لیز شدن گلبول‌های قرمز و کاهش اکسیژن (هیپوکسی) ناشی از کم‌خونی دانست. میزان آهن داخل سلولی به طور دقیق تنظیم می‌شود و اعتقاد بر این است که افزایش میزان این ماده در خارج از سلول باعث ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو و آسیب به چربی غشای سلول و اندامک‌ها می‌شود (Puntarulo 2005, Lipschitz et al. 1974, Barton et al. 1978, Stevens et al. 1988, Ferrali et al. 1990, Friedmann et al. 1999). هم‌چنین می‌توان بیان نمود که حدود ۲۰ میلیون انسان در ارتفاعات بیش از ۳۰۰۰ متر از سطح دریا و تحت شرایط هیپوکسی زندگی می‌کنند. اخیراً جمعیت افراد شاغل در ارتفاعات نیز افزایش یافته است. در دهه‌ی گذشته تعدادی از

[۱*] دانشجوی کارشناسی ارشد بافت‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه E-mail: ali.kalantari.histology@gmail.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

مطالعات در مورد رشد، تکامل و تولید، تحت شرایط هیپوکسی انجام گرفته است (Bustos-Obregón et al. 2006, Wu R.S.S 2009) . گزارش‌ها نشان می‌دهند که هیپوکسی مزمن اسپرماتوژنز را در موش‌های صحرایی و میمون متوقف می‌کند (Macome et al. 1977). هم‌چنین هیپوکسی در جوندگان نر از سنتز و آزاد شدن گونادوتروپین‌ها جلوگیری می‌کند (Khmel and Tarak 1991, Rattner et al. 1980). از آن جایی که فنیل‌هیدرازین به عنوان ماده‌ای مناسب برای القای این نوع کم خونی و مطالعه‌ی مکانیسم‌های کم‌خونی توصیف شده است، در این بررسی این ماده به عنوان عامل ایجاد کننده‌ی کم‌خونی به کار رفت (Berger 2007). هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثرات هیپوکسی به علت کم‌خونی همولیتیک و افزایش آهن ناشی از این نوع کم‌خونی بر ارزیابی کیفیت اسپرم‌های موش سوری است. هم‌چنین در این مطالعه به دلیل ویژگی آنتی‌اکسیدانتی کروسین مخصوصاً در مقابل اثرات سوء استرس اکسیداتیو نقش این ماده در جلوگیری از اثرات ناشی از استرس اکسیداتیو حاصل از آنمی همولیتیک القاء شده توسط فنیل‌هیدرازین، هیپوکسی و افزایش آهن بافتی مورد بررسی قرار گرفت (Mousavi et al. 2010, Vakili et al. 2012, Thushara et al. 2013).

مواد و روش کار

در این مطالعه فنیل هیدرازین[1] به عنوان عامل ایجاد کننده‌ی کم‌خونی همولیتیک مورد استفاده قرار گرفت (Gorustovich et al. 2006, Vannucchi et al. 2000, Grigorovich 1966).

تعداد ۴۹ موش سوری نر بالغ با وزن ۲۰-۲۵ گرم در ۷ گروه به صورت زیر تقسیم‌بندی شدند:

۱- گروه کنترل با تزریق روزانه‌ی سرم فیزیولوژی به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر.

۲- گروه دریافت‌کننده فنیل‌هیدرازین با دوز ۲ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن هر ۴۸ ساعت یک بار.

۳- گروه دریافت‌کننده فنیل‌هیدرازین با دوز ۴ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن هر ۴۸ ساعت یک بار.

۴- گروه دریافت‌کننده فنیل‌هیدرازین با دوز ۶ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن هر ۴۸ ساعت یک بار (Gorustovich et al. 2006).

۵- گروه دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین با دوز ۲ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن هر ۴۸ ساعت یک بار با تزریق هم‌زمان کروسین با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن هر ۲۴ ساعت یک بار (Hosseinzadeh et al. 2009).

۶- گروه دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین با دوز ۴ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن هر ۴۸ ساعت یک بار با تزریق هم‌زمان کروسین با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن هر ۲۴ ساعت یک بار.

۷- گروه دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین با دوز ۶ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن هر ۴۸ ساعت یک بار با تزریق هم‌زمان کروسین با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن هر ۲۴ ساعت یک بار.

تمامی تزریقات به صورت داخل صفاقی انجام گرفت. تزریقات فنیل‌هیدرازین به صورت تزریق اول با دوزهای ۸-۶-۴ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن و سپس در تزریقات بعدی هر ۴۸ ساعت، به ترتیب با دوزهای ۶-۴-۲ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن و کروسین نیز هر ۲۴ ساعت ۱ بار انجام گرفت. بعد از ۳۵ روز تزریق، موش‌ها به روش بی‌هوشی با دوز بالا و کشنده‌ی کتامین و زایلازین کشته شدند و پس از جدا کردن قسمت اپیدیدیم و قرار دادن آن در محیط HTF[2]، اسپرم‌های‌شان مورد بررسی قرار گرفت.

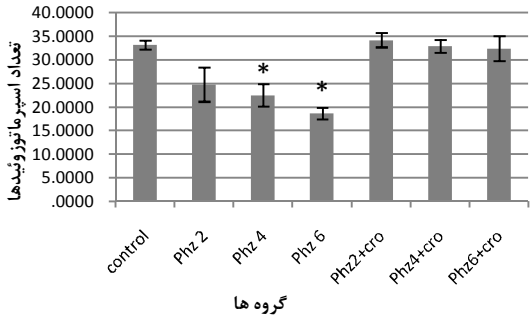
برای انجام این بررسی‌ها از هر گروه ۶ موش و از هر نمونه اسپرم ۱۰ لام برای هر رنگ‌آمیزی تهیه شد. بررسی‌های انجام شده شامل شمارش میانگین تعداد اسپرم

1- Phenyl hydrazine (Sigma Aldrich P6926)
2- Human tubal fluid

در واحد حجمی و رقت ثابت با استفاده از لام نئوبار، تعیین میزان درصد تحرک اسپرم، درصد زنده بودن اسپرم (رنگ‌آمیزی نگروزین ائوزین)، میزان شکستگی DNA (با روش رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج) و میزان بلوغ هسته (با روش رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو) است (Rezvanfar et al. 2013, Rezvanfar et al. 2008). نتایج حاصل از بررسی اسپرم‌ها با نرم‌افزار PASW Statistics 18 (SPSS) و با روش One-Way ANOVA آنالیز و از نظر معنی‌دار بودن در سطح (P<۰/۰۵) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

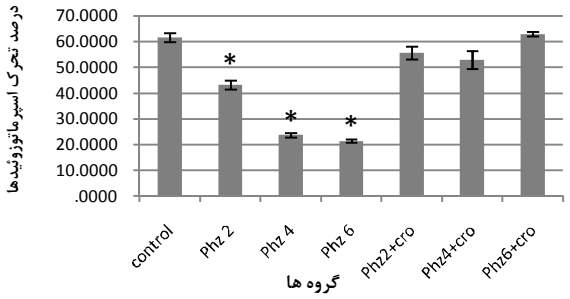
میانگین تعداد اسپرماتوزوئیدها در گروه کنترل حدود ۳۳۱۲۵۰۰۰±۹۴۳/۷ محاسبه گردید؛ در حالی که گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین با دوزهای ۴ و ۶ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن که دچار آنمی‌همولیتیک گردیده‌اند، میانگین تعداد اسپرماتوزوئیدها به طور معنی‌دار (P<۰/۰۵) کاهش نشان داد. در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین به همراه کروسین میانگین تعداد اسپرماتوزوئیدها با گروه کنترل فاقد اختلاف معنی‌دار بودند. هم‌چنین در مقایسه‌ی بین گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین به میزان ۴ و ۶ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن با گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین به همراه کروسین نیز، اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) مشاهده گردید (نمودار ۱).



نمودار ۱: تعداد اسپرماتوزوئیدها در گروه‌های مورد مطالعه

**** نشان‌گر معنی‌دار بودن (P<۰/۰۵) است.***

نتایج این مطالعه در مورد میزان تحرک اسپرماتوزوئیدها نشان داد که در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین، به‌تنهایی کاهش چشم‌گیری از نظر تحرک وجود دارد که این کاهش در هر سه گروه مورد آزمایش، با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). میزان تحرک اسپرم‌ها در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی دوزهای ۴ و ۶ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن به میزان معنی‌داری از گروه دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین به میزان ۲ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن کم‌تر بود؛ در حالی که دو گروه دریافت‌کننده‌ی فنیل هیدرازین به میزان ۴ و ۶ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن، فاقد اختلاف معنی‌دار با یکدیگر بودند (P<۰/۰۵). گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین همراه با کروسین در مورد تحرک اسپرم در حد گروه کنترل بود و در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین به‌تنهایی اختلافات معنی‌دار (P<۰/۰۵) مشاهده گردید (نمودار ۲).

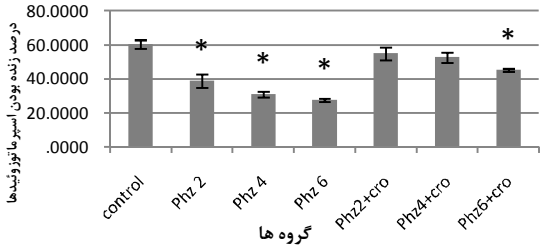


نمودار ۲: درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها در گروه‌های مورد مطالعه

**** نشان‌گر معنی‌دار بودن (P<۰/۰۵) است.***

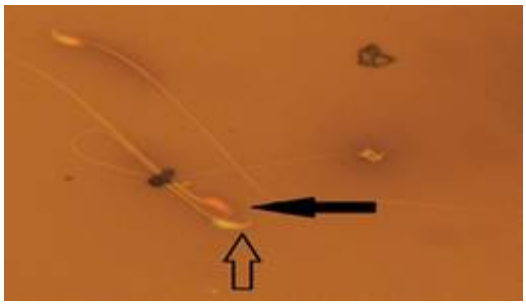
بررسی اسپرماتوزوئیدها از نظر میزان زنده بودن نیز، نشان داد که گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین به طور معنی‌دار دارای اسپرماتوزوئیدهای زنده‌ی کم‌تر نسبت به گروه کنترل بودند (P<۰/۰۵). هم‌چنین در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین به همراه کروسین نشان داده شد که میزان متوسط اسپرم‌های زنده نزدیک به گروه کنترل بوده و گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین با

دوزهای ۲ و ۴ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن به همراه کروسین فاقد اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل بودند. در حالی که در گروه دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین با دوز ۶ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن همراه با کروسین نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌دار دارای میانگین اسپرم کم‌تری بود؛ ولی همین گروه در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین به میزان ۴ و ۶ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن به طور معنی‌دار دارای تعداد اسپرماتوزوئیدهای زنده‌ی بیشتری بود (P<۰/۰۵). در مقایسه‌ی بین گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین، با گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین به همراه کروسین نیز، اختلافات معنی‌دار (P<۰/۰۵) مشاهده گردید (نمودار ۳ و تصویر ۱).



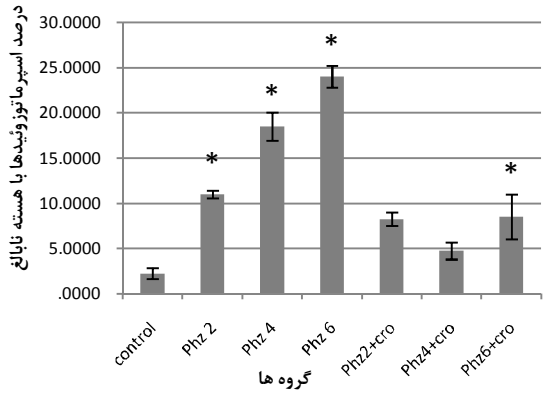
نمودار ۳: درصد زنده بودن اسپرماتوزوئیدها در گروه‌های مورد مطالعه

**** نشان‌گر معنی‌دار بودن (P<۰/۰۵) است.***



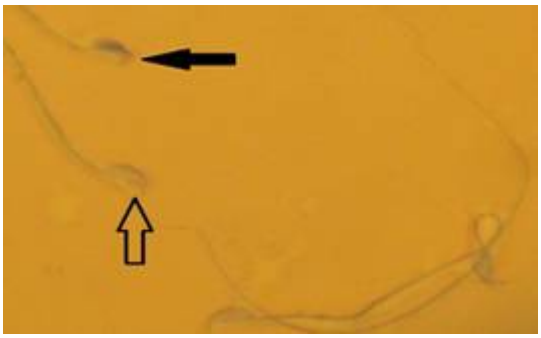
تصویر ۱: اسپرماتوزوئیدهای زنده با سر زرد رنگ (مشخص شده با پیکان بی‌رنگ) و اسپرم‌های مرده با سری قرمز رنگ (پیکان سیاه رنگ) (رنگ‌آمیزی ائوزین - نگروزین)

ارزیابی میزان عدم بلوغ هسته نشان داد که اسپرماتوزوئیدها در گروه دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌دار بوده و تعداد بیش‌تری از اسپرماتوزوئیدها دارای هسته‌های نابالغ و نارس بودند (P<۰/۰۵). هم‌چنین نشان داده شد که از نظر عدم بلوغ هسته گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین به میزان ۴ و ۶ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن به طور معنی‌دار (P<۰/۰۵) دارای اسپرم‌های نارس بیش‌تری نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین ۲ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن هستند. هم‌چنین مشاهده شد که گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین به میزان ۴ و ۲ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن همراه با کروسین فاقد اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل بوده؛ در حالی که فقط گروه دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین به میزان ۶ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن به همراه کروسین با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵)؛ با این حال، میانگین تعداد اسپرماتوزوئیدهای نارس در این گروه نیز، نسبت به دو گروه دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین، به تنهایی به میزان ۴ و ۶ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن کاهش معنی‌دار نشان داد (P<۰/۰۵). در مقایسه‌ی بین گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین، با گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین به همراه کروسین، نیز به طور معنی‌دار (P<۰/۰۵) کاهش تعداد سلول‌های نابالغ در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی کروسین مشاهده گردید (نمودار ۴، تصویر ۲).



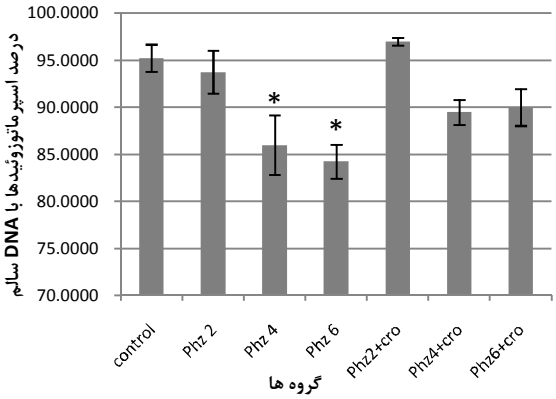
نمودار ۴: درصد اسپرماتوزوئیدها با هسته‌ی نابالغ در گروه-های مورد مطالعه

**** نشان‌گر معنی‌دار بودن (P<۰/۰۵) است.***



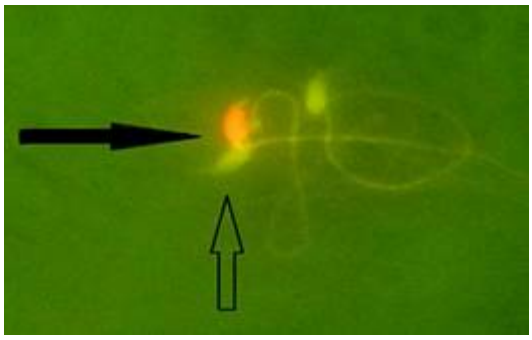
تصویر ۲: اسپرماتوزوئیدهای با هسته‌ی بالغ با سری به رنگ آبی کم رنگ (مشخص شده با پیکان بی‌رنگ) و اسپرماتوزوئیدهای با هسته‌ی نابالغ با سری به رنگ آبی پررنگ (پیکان سیاه رنگ) (رنگ‌آمیزی آنلین‌بلو).

ارزیابی سالم بودن DNA هسته‌ی اسپرماتوزوئیدها نشان داد که میانگین تعداد اسپرماتوزوئیدهایی که دارای هسته‌ی سالم از نظر DNA بودند، در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین به میزان ۴ و ۶ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن به طور معنی‌دار (P<۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین به میزان ۲ میلی‌گرم بر صد گرم وزن بدن کاهش نشان داد؛ در حالی که در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین همراه با کروسین میانگین اسپرماتوزوئیدهای سالم از نظر DNA نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین افزایش نشان داد (نمودار ۵، تصویر ۳). این گروه‌ها فاقد اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل بودند.



نمودار ۵: درصد اسپرماتوزوئیدهای با DNA سالم در گروه‌های مورد مطالعه

**** نشان‌گر معنی‌دار بودن (P<۰/۰۵) است.***



تصویر ۳: اسپرماتوزوئیدهای با DNA سالم با سر سبز رنگ (مشخص شده با پیکان بی‌رنگ) و اسپرماتوزوئیدهای با آسیب DNA با سر قرمز رنگ (پیکان سیاه رنگ) (رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج).

بحث

مطالعات نشان داده که آنمی همولیتیک از دو راه ممکن است اثر خود را اعمال نماید: اول آنمی و به دنبال آن کمبود اکسیژن؛ دوم استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش آهن خون. نشان داد شده است که فنیل‌هیدرازین علاوه بر ایجاد استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد، پراکسیداسیون چربی‌ها و تخریب اکسیداتیو اسپکترین غشای سلولی را نیز، موجب خواهد شد (Berger 2007). آنمی همولیتیک و لیز شدن گلبول‌های قرمز خون موجب کاهش ظرفیت انتقال اکسیژن و افزایش میزان آهن خون گردیده که این به نوبه‌ی خود پایه‌گذار یک رشته از تغییرات در بدن می‌شود (Lipschitz et al. 1974, Barton et al. 1978, Stevens et al. 1988, Ferrali et al, 1990, Friedmann et al. 1999). هم‌چنین نشان داده شده است که افزایش آهن بافتی از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو باعث آسیب شدید به پروتئین‌های غشاء و DNA می‌شود. همان طوری که در مطالعه‌ی حاضر مشاهده گردید، استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز فنیل‌هیدرازین موجب کاهش میانگین تعداد اسپرم‌ها گردیده است. هم‌چنین میزان تحرک اسپرم که بخشی از آن به عملکرد میتوکندری مربوط می‌شود، می‌تواند متأثر از هیپوکسی ناشی از آنمی باشد (Eurell and Brian 2006). در یک مطالعه اثر هیپوکسی مزمن روی اسپرماتوژنز انسان مورد بررسی قرار

گرفت و نشان داده شد که قرار گرفتن در ارتفاع ۲۰۰۰ تا ۵۶۰۰ متر بالاتر از سطح دریا موجب کاهش میانگین تعداد، تحرک و بلوغ اسپرم‌ها گردید که شش ماه پس از برگشت به موقعیت سطح دریا این عوارض بهبود پیدا نمود (Verratti et al. 2008) . در مطالعه‌ی حاضر نیز، نشان داده شد که میزان تحرک اسپرم وابسته به دوز فنیل‌هیدرازین کاهش یافت که در این رابطه نیز کروسین به طور معنی‌دار نقش محافظتی داشت (P<۰/۰۵). نتایج تحقیقات نشان داده است که حساس‌ترین بخش در دستگاه تناسلی جنس نر، اپی‌تلیوم زایگر لوله‌های منی‌ساز است. این موضوع شاید به این دلیل باشد که تحت شرایط هیپوکسی سلول‌هایی که در فاصله‌ی بیشتری نسبت به مویرگ‌ها و غشای پایه قرار دارند، اکسیژن کم‌تری دریافت نموده و به کمبود اکسیژن بیش‌تر حساس می‌باشند (Bustos-Obregón et al. 2006). در اثر کاهش فعالیت متابولیکی سلول‌های زایگر و کاهش تکثیر سلولی به دلیل کمبود اکسیژن، ضخامت طبقه‌ی بافت پوششی و قطر لوله‌های منی‌ساز کاهش یافته و فضای بینابینی به دلیل ادم بافتی افزایش می‌یابد (Bustos-Obregón et al. 2006). استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش آهن از طریق آسیب به غشای فسفولیپیدی اندامک‌ها اثرات سوء خود را نشان می‌دهد (Puntarulo 2005)، که به احتمال زیاد تغییرات نشان داده شده در مورد کاهش میزان زنده ماندن اسپرم در مطالعه‌ی حاضر نیز، ناشی از وقوع همین اتفاق روی سلول‌های بافت پوششی زایگر بیضه است. این عارضه نیز، وابسته به دوز فنیل هیدرازین بوده و تجویز کروسین موجب تعدیل این اثر گردیده است. نتایج گزارش‌ها نشان می‌دهد که قرار گرفتن در معرض هیپوکسی باعث کاهش چشم‌گیر در عملکرد بیضه می‌شود که این تأثیرات می‌تواند وابسته به اثرات مستقیم کمبود اکسیژن بر اسپرماتوژنز و یا اثرات غیر مستقیم از طریق تأثیر آن بر محور هیپوفیزی - بیضه‌ای باشد (Farias et al. 2005). علاوه بر این، کاهش میانگین تعداد اسپرم‌ها که در مطالعه‌ی حاضر به طور معنی‌دار (P<۰/۰۵) در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی فنیل‌هیدرازین در مقایسه‌ی با گروه کنترل مشاهده گردید، می‌تواند حاصل دو عامل باشد: ۱- کاهش اسپرم تولید شده در اپی‌تلیوم زایگر؛ ۲- عدم خروج کامل اسپرم‌ها (Geneser 2000) . قرار گرفتن در شرایط هیپوکسی، هم‌چنین باعث کاهش وزن اندام، تعداد اسپرم و افزایش ناهنجاری‌های اسپرم‌ها می‌گردد (Guyton and Hall 1996). تغییرات هسته در جهت متراکم شدن کروماتین و جایگزینی پروتامین به جای هیستون در مرحله‌ی اسپرمیوژنز اتفاق می‌افتد، که بیوسنتز چربی‌ها در این مرحله دارای اهمیت بالایی است (Komljenovic et al. 2009, Roqueta et al. 2009). بنابراین، استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز فنیل هیدرازین موجب اختلال در بیوسنتز چربی‌ها و بالا رفتن میانگین درصد اسپرم‌های با هسته‌ی نابالغ و یا با DNA شکسته گردیده است (Rezvanfar et al. 2008)، که این اثر نیز وابسته به دوز فنیل‌هیدرازین بوده و کروسین آن را جلوگیری و یا تعدیل نموده است. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که آنمی همولتیک ناشی از تجویز فنیل‌هیدرازین بر پارامترهای مختلف کیفیت اسپرم تأثیر منفی دارد و این تأثیر ناشی از ایجاد استرس اکسیداتیو است؛ چرا که کروسین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی (Mousavi et al. 2010, Vakili et al. 2012) قادر به خنثی کردن برخی از اثرات هیپوکسی بر فعالیت‌های متابولیکی موش (Farias et al. 2005) و بهبود تمامی پارامترهای مورد مطالعه تا حد طبیعی می‌باشد.

منابع

Barton, J.C.; Conrad, M.E.; Nuby, S. and Harrison, L. (1978). Effects of iron on the absorption and retention of lead, The Journal of laboratory and Clinical Medicine, 92: 536-547.

Berger, J. (2007). Phenylhydrazinehaematotoxicity. Journal of Applied Biomedicine. 5: 125–130.

Bustos-Obregón, E.; Esveile, C.; Contreras, J.; Maurer, I. and Sarabia, L. (2006). Effects of chronic simulated hypobaric hypoxia on mouse spermatogenesis, International Journal Morphology, 24(3):481-488.

Eurell, J.A. and Brian, L.F. (2006). Dellmann'sTextbook of Veterinary Histology. 6th Eds. Blackwell. Philadelphia, p: 233-255.

Farias, J.G.; Bustos-Obrego´n, E.; Orellana, R.; Bucarey, J.L.; Quiroz, E. and Reyes, J.G. (2005). Effects of chronic hypobaric hypoxia on testis histology and round spermatid oxidative metabolism. Andrologia, 37(1): 47-52.

Ferrali, M.; Ciccoli, L.; Signorini, C. and Comporti, M. (1990). Iron release and erythrocyte damage in allyl alcohol intoxication in mice, Biochemical Pharmacology, 40: 1485-1490.

Friedmann, B.; Jost, J.; Rating, T.; Weller, E.; Werle, E.; Eckardt, K.U. et al. (1999). Effects of iron supplementation on total body hemoglobin during endurance training at moderate altitude, International Journal of Sports Medicine, 20: 78-85.

Geneser, F.; organos de la reproduccin (2000). En Histologia. Sobre bases biomoleculares. Panamericana, Madrid, p: 638-663.

Gorustovich, A.A.; Steimetz, T.; Giglio, M.J. and Guglielmotti, M.B. (2006). A histomorphometric study of alveolar bone modeling and remodeling under experimental anaemia and polycythaemia in rats, Archives of Oral Biology, 51: 246-251.

Grigorovich, N.A. (1966). Pathogenesis of hemolytic anemia caused by phenylhydrazine. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 61(2): 126-129.

Guyton, A. and Hall, J. (1996). Fisiologda de la aviacin, lasgrandesAlturasy el espacio. En Tratado de FisiologiaMedica. McGraw-Hill, Madrid, pp: 591-598.

Hosseinzadeh, H.; Modaghegh, M.H. and Saffari, Z. (2009). *Crocus sativus* L. (Saffron) extract and its active constituents (crocin and safranal) on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle, Evidenco-based Complementary and Alternative Medicine, 3(6): 343-350.

Hosseinzadeh, H. and Talebzadeh, F. (2005). Anticonvulsant evaluation of safranal and crocin from *Crocus sativus* in mice, Fitoterapia, 76: 722-724.

Khmel'nitskii, O.K. and Tararak, T.Ia. (1991). Morphological characteristics of the pituitary-gonad system in high altitude hypoxia. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 111:432-436.

Komljenovic, D.; Sandhoff, R.T.; Tiegler, A.; Heid, H.; Just, W.W. and Gorgas, K. (2009). Disruption of blood-testis barrier dynamics in ether-lipid-deficient mice. Cell and Tissue Research, 337(2): 281-299.

Lipschitz, D.A.; Cook, J.D. and Finch, C.A. (1974). A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores, New England Journal of Medicine, 290: 1213-1216.

Macome, J.C.; Costa, L.E.; Martin, I.H. and Taquini, A.C. (1977). Steroid biosynthesis by gonads of rats submitted to chronic hypobaric hypoxia. Acta Physiologiva Latino Americana, 27:249-257.

Mousavi, S.H.; Tayarani, N.Z. and Parsaee, H. (2010). Protective effect of saffron extract and crocin on reactive oxygen species-mediated high glucose-induced toxicity in PC12 cells, Cellular and Molecular Neurobiology, 30: 185-191.

Puntarulo, S. (2005). Iron, oxidative stress and human health. Molecular Aspects of Medicine, 26(4–5): 299-312.

Rattner, B.A.; Macmillan, B.T.; Michael, S.D. and Altland, P.D. (1980). Plasma gonadotrophins, prolactin and corticosterone concentrations in male mice exposed to high altitude. Journal Reproduction and Fertility, 60:431-436.

Rezvanfar, M.; Sadrkhanlou, R.; Ahmadi, A.; Shojaei-Sadee, H.; Rezvanfar, M.; Mohammadirad, A. et al. (2008). 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. Human and Experimental Toxicology, 27(12): 901-910.

Rezvanfar, M.A.; Rezvanfar, M.A.; Shahverdi, A.R.; Ahmadi, A.; Baeeri, M.; Mohammadirad, A. et al. (2013). Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity, DNA damage and chromatin abnormality by selenium nano-particles, Toxicology and Applied Pharmacology, 266: 356-365.

Roqueta-Rivera, M.; Stroud, C.K.; Haschek, W.M.; Akare, S.J.; Segre, M.; Brush, R.S. et al. (2009). Docosahexaenoic acid supplementation fully restores fertility and spermatogenesis in male delta-6 desaturase-null mice. The Journal of Lipid Research, 51(2):360-367.

Stevens, R.G.; Jones, D.Y.; Micozzi, M.S. and Taylor, P.R. (1988). Body iron stores and the risk of cancer, New England Journal of Medicine, 319: 1047-1052.

Thushara, R.M.; Hemshekhar, M.; Sebastin Santhosh, M.; Jnaneshwari, S.; Nayaka, S.C.; Naveen, S. et al. (2013). Crocin, a dietary additive protects platelets from oxidative stress-induced apoptosis and inhibits platelet aggregation. Journal of Molecular and Cellular Biochemistry, Volume 373, Issue 1-2: 73-83.

Vakili, A.; Einali, M.R. and Bandegi, A.R. (2014). Protective effect of crocin against cerebral ischemia in a dose-dependent manner in a rat model of ischemic stroke, Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases, 23(1): 106-113.

Vannucchi, A.M.; Paoletti, F.; Linari, S.; Cellai, C.; Caporale, R.; Ferrini, P.R. et al. (2012). Identification and characterization of a bipotent (erythroid and megakaryocytic) cell precursor from the spleen of phenylhydrazine-treated mice, The American Society of Hematology , 95 (8): 2559-2568.

Verratti, V.; Berardinelli, F.; Di Giulio, C.; Bosco, G.; Cacchio, M., Pellicciotta, M. et al. (2008). Evidence that chronic hypoxia causes reversible impairment on male fertility. Asian Journal Andrology, 10(4): 602-606.

Wu, R.S.S. (2009). Chapter 3 Effects of Hypoxia on Fish Reproduction and Development. Fish Physiology. A. P. F. Jeffrey G. Richards and J. B. Colin, Academic Press. Volume 27: 79-141.

Evaluation of sperm quality in phenylhydrazine-induced hemolytic anemia impacts on mice and protective role of crocin

Kalantari Hesari, A.[1]; Shahrooz, R.[2]; Ahmadi, A.[2] and Malekinejad, H.[2]

Received: 16.04.2013 Accepted: 30.11.2013

Abstract

Hemolytic anemia and its produced hypoxia can cause a dysfunction in the testis and spermatogenesis. Iron delivered from hemolysis of erythrocytes can also stimulate oxidative stress. In this study, the aim of this study was to investigate the protective effect of crocin on sperm quality in animals that were exposed against hemolytic anemia induced by phenylhydrazine. Forty nine male and adult mice (20-25g) were grouped within 7 groups. First group was control and treated with normal saline, and test groups were nominated as 2, 3, and 4 and were treated with phenylhydrazine 2, 4, and 6 mg/100g/48 h (i.p.). Animals in groups 5, 6, and 7 were treated with crocin (200 mg/k/day, i.p.) in addition of 2, 4, and 6 mg/100g/48 h phenylhydrazine IP. After 35 days, semen samples were collected from tail of epididymis and the sperm quality parameters including sperm total count, motility, viability, nuclear maturity, and DNA damage were examined. Results showed that phenylhydrazine – induced hemolytic anemia resulted in a remarkable reduction in sperm total count, motility, percentage of viability, percentage of sperm with intact DNA and increased the number of immature sperms, while those groups which were treated with crocin showed significant ($P<0.05$) improvement in sperm quality parameters. The results may suggest a protective effect of crocin against the phenilhydrazine-induced anemia, which attribute to its antioxidant effects.

Key words: Hemolytic anemia, Hypoxia, Tissue iron, Phenyl hydrazine, Crocin, Sperm quality

1- Msc Student of Histology from Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Iran
2- Assistance Professor, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Iran
Corresponding Author: Kalantari Hesari, A., E-mail: ali.kalantari.histology@gmail.com