Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 19:21 +0330 on Saturday November 18th 2017

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2013; 15(69): 85-94

The effect of atrazine on spermic parameters and fertility potential in mature rats

Najafi Gh(DVSc)[1]*, Hobenaghi R(Ph.D)[2], Hoshyari A(M.Sc)[1], Moghadaszadeh M(M.Sc)[3], Ghorbanzadeh B(M.Sc)[4]

1- Department of Anatomy-Embryology, Urmia University, Urmia, Iran
2- Department of Pathology, Urmia University, Urmia, Iran
3- Department of Bacteriology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
4- Department of Parasitology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received: 21 Apr 2012, Accepted: 19 Sep 2012

Abstract

Background: Atrazine is an herbicide used widely by farmers in controlling weeds. The aim of this investigation was to evaluate the effect of atrazine, as an herbicide, on sperm quality, sperm DNA damage, invitrofertilization (IVF), and embryonic development in mature male rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 42 mature male Wistar rats weighing 170±5g were divided into three groups, including one control and two treatment groups. The rats in the control group were administered corn oil (0.2 ml/day) and the rats in the test groups were orally gavaged with atrazine 150mg/kg (high dose) and 75mg/kg (low dose) body weight daily for a total of 45 days. Epidydimis tail was cut and placed in 1 ml of human tubular fluid (HTF) medium for 30 minutes in an atmosphere of 5% CO_2 in air at 37^0C. The sperms were analyzed for sperm count, sperm viability, motility, DNA damage, immature sperm, and in vitro fertilization. Data were analyzed by One-Way ANOVA.

Results: In this study, atrazine provoked a significant decrease ($P<0.05$) in sperm number, sperm viability, and sperm motility. The data suggest that the atrazine had a negative impact on sperm maturation and DNA integrity in a time-dependent manner, which consequently caused a significantly remarkable reduction in IVF ability ($P<0.05$).

Conclusion: Atrazine is capable of inducing DNA damage and chromatin abnormalities of spermatozoa which can contribute to a low fertilization rate.

Keywords: Atrazine, rats, spermatozoa

*Corresponding author:
Address: Department of Anatomy-Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
Email: g.najafi2006@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 19:21 +0330 on Saturday November 18th 2017

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 15، شماره 9 (شماره پیاپی 69)، اسفند 1391، 94-85

اثر آترازین بر روی پارامترهای اسپرمی و توان باروری آزمایشگاهی در رت‌های بالغ

غلامرضا نجفی[1*]، رحیم حب نقی[2]، عارف هوشیاری[3]، مسعود مقدس زاده[4]، بهزاد قربانزاده[5]

1- استادیار، گروه آناتومی و جنین شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
2- دانشیار، گروه آسیب شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
3- دانشجوی دکترای تخصصی علوم تشریح، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
4- دانشجوی دکترای تخصصی باکتری شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
5- مربی، گروه انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: 91/2/2 تاریخ پذیرش: 91/6/29

چکیده

زمینه و هدف: آترازین علف کشی است که به طور گسترده برای کنترل علف‌های هرز توسط کشاورزان مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف از این تحقیق ارزیابی اثر آترازین به عنوان یک علف کش بر روی کیفیت، تغییرات DNA اسپرم، توان باروری آزمایشگاهی و رشد جنین در رت‌های نر بالغ می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از 42 رت نر بالغ از نژاد ویستار با وزن 5±170 گرم استفاده شد. رت‌ها به سه گروه شامل گروه کنترل و دو گروه تیمار تقسیم شدند. در گروه کنترل رت‌ها 0/2 میلی‌لیتر در هر روز روغن ذرت و در گروه تیمار آترازین را با دوز 150 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (دوز بالا) و دوز 75 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (دوز پایین) روزانه به مدت 45 روز از طریق خوراکی توسط گاواژ دریافت کردند. دم اپیدیدیم بریده شده و به داخل 1 میلی‌لیتر محیط کشت HTF به مدت 30 دقیقه در داخل انکوباتور CO_2 5 درصد و دمای 37 درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. تعداد اسپرم، قابلیت زنده ماندن اسپرم، تحرک، آسیب DNA اسپرم، ارزیابی اسپرم‌های نابالغ و بررسی توان باروری آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفتند. داده‌ها توسط آزمون آنالیز واریانس یک طرفه مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: در این مطالعه آترازین باعث کاهش معنی‌داری($p<0/05$) در تعداد اسپرم، قابلیت زنده ماندن اسپرم و تحرک اسپرم‌ها شد. داده‌ها نشان داد که آترازین اثر منفی بر روی بلوغ اسپرم‌ها و ساختار DNA اسپرم‌ها در طول زمان دارد که نتیجه آن کاهش قابل توجهی و معنی‌داری($p<0/05$) در توان باروری بود.

نتیجه‌گیری: آترازین قادر به ایجاد آسیب DNA و ناهنجاری‌های کروماتین اسپرم‌ها بوده و می‌تواند عامل کاهش در توان باروری باشد.

واژگان کلیدی: آترازین، رت، اسپرماتوزوآ

***نویسنده مسئول :** ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه آناتومی و جنین شناسی

Email: g.najafi2006@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 19:21 +0330 on Saturday November 18th 2017

مقدمه

استفاده از سموم کشاورزی با افزایش جمعیت و تقاضاً برای محصولات کشاورزی به شدت افزایش یافته است(1). سموم کشاورزی از راه‌های مختلف از جمله پوست، مواد غذایی و دهان وارد بدن شده و در بافت‌های مختلف بدن تجمع پیدا کرده و باعث ایجاد یک سری عوارض در بافت‌های بدن می‌شوند. آفت‌کش‌ها می‌توانند باعث جهش در ژن و تکثیر سریع سلول‌های سرطانی در بدن گردند. آفت‌کش‌ها تاثیرات سمی روی سیستم ایمنی بدن دارند، بنابراین باعث از کار انداختن مکانیسم طبیعی مقابله با سرطان در بدن می‌گردند. سرطان بیضه و پروستات در اروپا و آمریکا در بین کارگرانی که با علف‌کش‌های گروه فنوکسی و کلروفنول در تماس هستند، بیشتر دیده می‌شود. آفت‌کش‌ها دارای اثرات مخرب و سمی روی اندام‌های تولید مثلی، تداخل در اعمال هورمونی، عقیمی مردان و زنان و دوره‌های قاعدگی نامنظم در زنان هستند(4-2). تحقیقات نشان داده است که سموم کشاورزی باعث سقط جنین، عدم رشد فکری، اثرات مخرب ساختمانی در بدن هنگام تولد و نقص‌هایی در اعمال و بافت‌های بدن می‌شوند. مطالعات نشان داده که سم کپون و سم کاربارل باعث کاهش حرکت اسپرم‌ها و کوتاه شدن عمر اسپرم‌ها و ایجاد اشکال غیر طبیعی در اسپرم می‌شود(5). مشخص شده است که علف‌کش D 24 برای سیستم تولید مثلی مسمومیت‌زا است به طوری که آزمایشات نشان داده است که بین این سم و کاهش تعداد اسپرم، افزایش اسپرم‌های به شکل ارتباط مستقیم وجود دارد. بررسی‌های انجام شده روی 800 مرد نشان داده که میزان باروری مردانی که در محیط کارشان با سموم مواجه هستند در مقایسه با سایر افراد کاهش معنی‌داری دارد. تحقیقات مشابهی در هلند روی باغداران نشان داد که این افراد مدت زمان بیشتری برای بچه دار شدن نیاز دارند، این مدت در بهار و تابستان که علف‌کش‌ها بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند تقریباً دو برابر است(6، 7). آترازین با فرمول 2- کلرو4- اتیل آمینو 6- ایزوپروپیل آمینو 1-3-5 تری آزین 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1-3-5-triazinre) از جمله علف‌کش‌های انتخابی برای از بین بردن علف‌های هرز با مکانیسم متوقف کردن فتوسنتز در علف‌های هرز و در برخی از گیاهان زراعی در مزارع مختلف از جمله مزارع ذرت و گندم مورد استفاده قرار می‌گیرد(8). مطالعات اخیر نشان داده است که آترازین در پستانداران بر روی گیرنده‌هایی که هورمون‌ها بر روی آنها عمل می‌کنند، اثر مهاری دارد. مطالعات نشان داده که سم آترازین باعث کاهش فعالیت آنزیم 5 آلفا ردوکتاز می‌شود که خود این آنزیم در متابولیسم هورمون تستوسترون نقش بسیار مهمی را دارد که باعث تبدیل شدن تستوسترون به متابولیت فعال بنام 5 آلفا دی هیدروتستوسترون در قسمت قدامی غده هیپوفیز و غده پروستات می‌گردد(13-9). مطالعات نشان داده است که آترازین در نرها باعث تحریک قسمت قدامی هیپوفیز و در نتیجه افزایش هورمون (Follide Stimulating Haranonz-FSH) می‌گردد در حالی که در ماده‌ها باعث کاهش هورمون تحریک کننده فولیکولار ولی در عوض باعث افزایش هورمون لوتئین کننده (Luteinizing Hormout-LH) می‌گردد(14). با توجه به استفاده زیاد از این علف کش در اکثر مزارع در کشور ما و عدم استفاده صحیح کشاورزان از این سم و این که آترازین بعد از سم‌پاشی می‌تواند بیش از یک سال و یا یک فصل زراعی در زمین باقی بماند و حتی آب‌های زیر زمینی را آلوده کند بنابراین مطالعه بیشتر در مورد اثر این سم بر روی سیستم تولید مثلی و بررسی باروری آزمایشگاهی (Invitro Fertilisation-IVF) لازم و ضروری بود. هدف از این مطالعه بررسی اثرات آترازین بر روی پارامترهای کمی و کیفی اسپرم هم‌چنین بررسی باروری آزمایشگاهی در رت‌ها بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی بوده و برای انجام آن از 42 رت نر بالغ با میانگین وزنی 5±170 گرم استفاده شد. رت‌ها از مرکز تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشکده

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 19:21 +0330 on Saturday November 18th 2017

دامپزشکی ارومیه تهیه و در قفس‌های مخصوص در داخل یک اتاق کنترل شده با درجه حرارت3±20 درجه سانتی‌گراد و سیکل 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی نگهداری شدند. آب و غذا به صورت آزاد در اختیار رت‌ها گذاشته شد. رت‌ها به سه گروه تقسیم شدند:

1- گروه کنترل: در این گروه (6 رت) به هر رت 0/2 میلی‌لیتر روغن ذرت روزانه تا 45 روز به صورت خوراکی از طریق گاواژ خورانده شد.

2- گروه دوز بالا: (18 رت) در این گروه رت‌ها آترازین را با دوز 150 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی از طریق گاواژ تا 45 روز دریافت کردند.

3- گروه دوز پایین: (18 رت) رت‌ها سم آترازین را با دوز 75 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی از طریق گاواژ تا 45 روز دریافت کردند.

دوز لازم آترازین با استفاده از روغن ذرت تهیه گردید و نمونه‌برداری از رت‌ها و انجام آزمایشات لازم در روزهای 15، 25 و 45 بعد از تیمار صورت گرفت.

رت‌ها با استفاده از گاز CO_2 بیهوش شده سپس ناحیه شکم آنها باز و دم اپیدیدیم به همراه قسمتی از کانال دفران برداشته شده و در داخل 1 میلی‌لیتر محیط کشت HTF حاوی 4 میلی‌گرم آلبومینی سرم گاوی (Bovine serum Albumin-BSA) در داخل انکوباتور 5 Co_2 درصد با درجه حرارت 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه گذاشته تا اسپرم‌ها وارد محیط کشت شوند. محیط کشت HTF مورد استفاده در این تحقیق به صورت آماده از شرکت سیک آی وی اف (SAGE IVF) با کد محصول 1020 خریداری شد.

طبق دستورالعمل بهداشت جهانی تحرک اسپرم‌ها به صورت تحرک پیشرونده سریع، تحرک پیشرونده کند یا آهسته، تحرک بدون پیشروندگی یا درجا و عدم تحرک مورد ارزیابی قرار گرفت(15).

از اسپرم‌های به دست آمده از اپیدیدیم رقت 1 به 20 (5 میکرولیتر اسپرم موجود در محیط کشت با 95 میکرولیتر رقیق کننده ساخته می‌شود) تهیه کرده سپس 10 میکرولیتر از نمونه رقیق شده از رقت تهیه شده به خانه‌های شمارش‌گر هموسیتومتر منتقل گردید. اسپرماتوزوئیدها در 10 مربع بزرگ شمارش شده و با استفاده از فرمول زیر تعداد اسپرماتوزوئیدها به دست آمد(15).

عدد به دست آمده از 10 مربع بزرگ تقسیم بر عدد 2

(فاکتور تبدیل) x 50000 x عکس رقت = تعداد اسپرم

برای این منظور از رنگ آمیزی آنیلین بلو استفاده شد. بدین صورت که از اسپرم‌های موجود در محیط کشت اسمیر تهیه شده و بعد از خشک شدن، توسط محلول فیکساتیو گلوتارآلدهید 3 درصد به مدت نیم ساعت فیکس شده سپس اسمیرها توسط رنگ آنیلین بلو 5 درصد (با استفاده از اسید استیک 4 درصد) به مدت 5 الی 8 دقیقه رنگ آمیزی شده و در صد اسپرم‌های بالغ با سر بی رنگ و اسپرم‌های نابالغ با سر آبی رنگ با استفاده از میکروسکوپ نوری به دست آمدند. تعداد زیادی اسیدهای آمینه لیزین در ساختار پروتئین هیستون وجود دارد که این اسیدهای آمینه با رنگ‌های اسیدی مثل آنیلین بلو واکنش نشان داده وآبی رنگ می‌شود در نتیجه اسپرم‌هایی که در مرحله بلوغ (متراکم شدن) دارای تعداد زیادی هیستون اضافی در کروماتین خود باشند با رنگ آمیزی آنیلین بلو رنگ شده و آبی رنگ دیده می‌شوند و اینها اسپرم‌هایی هستند که در مرحله بلوغ اسپرم دچار مشکل شده‌اند و تحت عنوان اسپرم‌های نابالغ در نظر گرفته می‌شوند(16).

بررسی درصد اسپرم‌ها با DNA آسیب دیده:

برای بررسی اسپرم‌ها با DNA آسیب دیده از رنگ آمیزی آکریدین اورانج استفاده شد. این رنگ آمیزی برای تفریق DNA سالم و دو رشته‌ای از DNA دناتوره شده تک رشته‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. اسپرم‌ها با DNA سالم بعد از رنگ آمیزی در زیر میکروسکوپ فلورسنت به رنگ سبز دیده می‌شوند در حالی که اسپرم‌ها با DNA آسیب دیده به رنگ نارنجی دیده می‌شوند. اسمیرها با استفاده از محلول کارنوی به مدت 2 ساعت در هوای آزمایشگاهی فیکس شدند و سپس اسمیرها توسط رنگ آکریدین اورنج تازه تهیه شده در بافر سیترات فسفات

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 19:21 +0330 on Saturday November 18th 2017

(0/19میلی‌گرم پودر آکریدین اورنج در 100 میلی‌لیتر بافر سیترات فسفات) به مدت 10 دقیقه رنگ آمیزی شده و در زیر میکروسکوپ فلورسنت مورد ارزیابی قرار گرفتند(16).

ابتدا به رت‌های ماده بالغ با وزن متوسط 15±140 گرم، 30 واحد بین المللی هورمون گنادوتروپین سرم مادیان آبستن (Pregnant mare serum gonadotropin-PMSG) (شرکت فولیگون- هلند) به صورت داخل صفاقی تزریق شد و بعد از گذشت 48 الی 56 ساعت از تزریق هورمون گنادوتروپین سرم مادیان آبستن، هورمون گنادوتروپین جفت انسان (Human chorionic gonadotropin-HCG) (شرکت سیگما) به میزان 15 واحد بین المللی به صورت داخل صفاقی تزریق شد. 12 الی 16 ساعت بعد از تزریق هورمون گنادوتروپین جفت انسانی تخمک‌گیری از رت‌ها به روش دیسکت کردن از ناحیه آمپول اویداکت در زیر استریومیکروسکوپ یا لوپ (اولیمپوس، آمریکا) صورت گرفت. تخمک‌های به دست آمده در داخل یک قطره لقاح 500 میکرولیتری محیط (Human Tobolar Fluid-HTF) حاوی 4 میلی‌گرم BSA گذاشته شد. سپس 1 میلیون اسپرم به توانایی رسیده به ازای هر میلی‌لیتر از محیط کشت، از اسپرم‌های توانا شده را به قطره لقاح اضافه کرده و بعد از گذشت 6 الی 9 ساعت با مشاهده دو پیش هسته درصد لقاح به دست آمد. زیگوت‌های به دست آمده بعد از چند بار شستشو به داخل قطرات کشت 250 میکرولیتری از محیط کشت اختصاصی رت (mR1ECM) انتقال داده شدند سپس درصد بلاستوسیست‌ها در روز 5 بعد از لقاح به دست آمد(17).

لازم به ذکر است که محیط کشت اختصاصی رت در آزمایشگاه جنین شناسی به صورت استوک A وB تهیه شده سپس از هر استوک به میزان مشخص جهت تهیه استوک نهایی یا محیط کشت استفاده گردید.

طرز تهیه استوک A :

کلرید سدیم 6/42 گرم (شرکت سیگما)، کلرید پتاسیم 0/239 گرم (شرکت سیگما)، گلوکز 1/352 گرم (شرکت سیگما)، پنی‌سیلین جی 0/075 گرم سیگما، استرپتومایسین 0/050 گرم (شرکت سیگما) لاکتات سدیم 1/9 میلی‌لیتر (شرکت سیگما) را در 100 میلی‌لیتر آب سه بار تقطیر حل کرده و سپس با استفاده از فیلتر 0/20 فیلتر نموده و تحت عنوان استوک A در داخل یخچال 4 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

طرز تهیه استوک B :

برای تهیه آن کلرید کلسیم به میزان 0/294 گرم (شرکت سیگما) و کلرید منیزیم 0/102 گرم (شرکت سیگما) را در 100 میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل نموده و بعد از فیلتر کردن در یخچال4 درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

طرز تهیه محیط اختصاصی رت:

در داخل یک فلاکس محیط کشت 10 میلی‌لیتر از استوک A و 10 میلی‌لیتر از استوک B را ریخته و به آن 0/210 گرم بی‌کربنات سدیم (سیگما)، 0/0055 گرم پیرووات سدیم (سیگما)، 0/0146 گرم گلوتامین ال (سیگما)، 2 میلی‌لیتر اسیدهای آمینه ضروری (سیگما) و 1 میلی‌لیتر اسیدهای آمینه غیر ضروری (سیگما) اضافه نموده سپس حجم آن را با استفاده از آب سه بار تقطیر به 100 میلی‌لیتر رسانده و محیط را فیلتر و مورد استفاده قرار دادیم.

داده‌های به دست آمده از گروه‌های مختلف مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 17 و آزمون آماری آنووای یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

تمامی مراحل این طرح تحت نظارت کمیته حمایت از حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی ارومیه و با کسب مجوز از کمیته اخلاقی به شماره 3/155/پ دانشگاه ارومیه انجام شده است.

یافته‌ها

در این مطالعه مشخص شد که تعداد اسپرم‌ها در گروه دوز بالا و پایین آترازین در طول زمان کاهش یافته ولی در گروه دوز بالا در روز 25 و 45 و در دوز پایین در روز 45 کاهش اسپرم اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل دارد($p<0/05$). اما کاهش اسپرم در روز 15 دوز بالا و

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 19:21 +0330 on Saturday November 18th 2017

روزهای 15 و 25 دوز پایین هیچ اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نداشت(p>0/05). هم‌چنین تحرک پیشرونده سریع اسپرم‌ها هم در دوز بالا و هم پایین آترازین در طول زمان کاهش یافته ولی در روز 45 در دوز بالا اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل داشت(p<0/05). مشخص گردید که تحرک پیشرونده متوسط در این مطالعه در هر دوز بالا و پایین آترازین، افزایش یافته ولی اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نداشت(p>0/05). درصد اسپرم‌ها با تحرک کند در طول زمان افزایش یافته ولی اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نشان نداد(p>0/05). هم‌چنین درصد اسپرم‌های فاقد حرکت در هر دوز بالا و پایین در طول زمان افزایش یافته و این اسپرم‌های فاقد حرکت در دوز بالا در روز 45 اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نشان داد(p<0/05) (جدول 1).

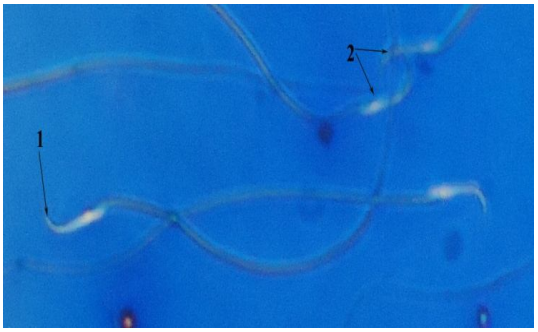
جدول1. مقایسه میانگین تعداد کل اسپرم (1×10^6)، درصد تحرک پیشرونده، متوسط، کند و فاقد تحرک اسپرم‌ها در گروه های مختلف مورد مطالعه

گروه‌ها	دوز بالا روز 15	دوز بالا روز 25	دوز بالا روز45	دوز پایین روز 15	دوز پایین روز 25	دوز پایین روز 45	کنترل
تعداد اسپرم	7/79±44/20	3/87±30/00	2/40 b ±11/6	5/89 a ±44/8	4/2 a ±41/8	6/22 b ±25/8	3/7 a ±47/8
تحرک پیشرونده سریع	4/99a ±24/75	8/58a ±28/50	2/38 b ±9/50	7/63 a ±28/75	9/06 a ±28//25	4/72 a ± 25/50	3/77 a±75/28
تحرک پیشرونده متوسط	1/91 a ±36/50	1/15 a ±36/00	6/65 a ±42/75	1/25 a ±35/25	1/91 a ±35/50	3/78 a ±37/50	1/70 a±75/24
تحرک کند یا درجا	2/87 a ±17/25	1/50 a ±16/75	2/62 a ±19/25	2/38 a ±16/50	2/06 a ±16/25	3/16a ±17/00	1/63 a±15/00
فاقد تحرک	3/10 a ±21/50	2/98 a ±19/25	4/48 b ±30/50	3/87 a ±19/50	2/5 a ±19/75	2/08 a ±20/50	7/36 a±75/18

داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار بوده و در هر ردیف میانگین‌ها با حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌داری می‌باشند(p<0/05)

در این تحقیق مشخص شد که درصد اسپرم‌های نابالغ در گروهای دوز بالا و پایین آترازین در طول زمان افزایش یافته و اختلاف معنی‌داری در هر دو دوز در روزهای 25 و 45 با گروه کنترل دیده شد(p<0/05)(شکل1).

مشخص شد در گروهی که رت‌ها سم آترازین دریافت کرده اند در هر دو دوز تعداد اسپرم‌ها با DNA آسیب دیده (شکل 2) افزایش یافته ولی این افزایش تنها در دوز بالا در روز 45 اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نشان داد(p<0/05) (جدول 2).



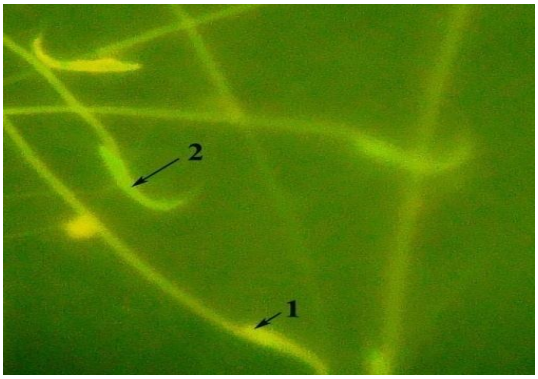
شکل 1. در گروه دوز پایین در روز 25 اسپرم‌ها با سر روشن (1) اسپرم‌های بالغ و اسپرم‌ها با سر آبی پر رنگ(2) اسپرم‌های نابالغ می‌باشند (رنگ آمیزی آنیلین بلو، بزرگنمایی ×1000)

جدول2. مقایسه میانگین درصد اسپرم‌های نابالغ و درصد اسپرم‌ها با DNA آسیب دیده در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

گروهها	دوز بالا روز 15	دوز بالا روز 25	دوز بالا روز 45	دوز پایین روز 15	دوز پایین روز 25	دوز پایین روز 45	کنترل
رنگ آمیزی آنیلین بلو	0/25 a ±2/25	1/06 b ±7/50	2/13 b ±9/25	0/38 a ±2/50	0/95 b ±2/25	78/3 b ±10/50	0/95 a ±1/75
رنگ آمیزی آکریدین اورنج	1/25 a ±9/25	1/91 a ±12/50	2/75 b ±16/25	3/25 a ±10/50	2/88 a ±8/50	4/19 a ±11/75	2/64 a ±8/50

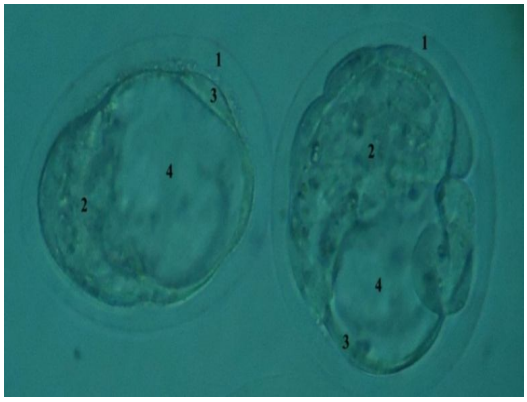
داده‌ها بصورت میانگین ± انحراف معیار بوده و در هر ردیف میانگین ها با حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌داری می‌باشند(p<0/05)

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 19:21 +0330 on Saturday November 18th 2017

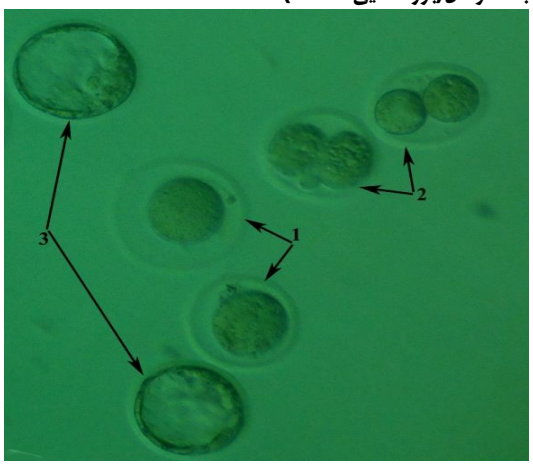


شکل 2. در گروه دوز بالا در روز 45 اسپرم‌ها با سر سبز رنگ (2) مربوط به اسپرم‌های با DNA سالم بوده و اسپرم‌ها با سر نارنجی (1) اسپرم‌های با DNA آسیب دیده می‌باشند(رنگ آمیزی آکریدین اورنج، بزرگنمایی ×1000).

درصد لقاح اووسیت‌ها در گروه دوز بالا و پایین در طول زمان کاهش یافته و در دوز بالا در روزهای 25 و 45 و در دوز پایین در روز 45 این کاهش اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نشان داد($p<0/05$). درصد بلاستوسیست‌ها در گروه دوز بالا و دوز پایین در طول زمان کاهش یافته ولی از نظر آماری در دوز بالا و دوز پایین در روز 45 این کاهش درصد بلاستوسیست‌ها اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نشان داد($p<0/05$) (شکل 3 و 4)(جدول 3).



شکل 3. در این تصویر دو بلاستوسیست در گروه کنترل روز 4 بعد از باروری آزمایشگاهی دیده شده است 1- پرده شفاف مشخص در اطراف اووسیت 2- توده سلول داخلی که جنین را تشکیل خواهند داد 3- سلول‌های کشیده بنام تروفوبلاست که بعدا پرده جنینی را تشکیل خواهند داد 4- حفره بلاستوسل(بزرگنمایی ×100)



شکل 4. در این تصویر دو تخمک لقاح نیافته (1) و دو جنین که در مرحله دوسلولی ارست شده (2) و دو بلاستوسیت (3) در روز 5 در گروه دوز بالا روز 45 دیده شده است(بزرگنمایی ×100)

جدول3. مقایسه میانگین درصد لقاح و درصد بلاستوسیست‌ها در دوز بالا و دوز پایین در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

گروه ها	دوز بالا روز 15	دوز بالا روز 25	دوز بالا روز45	دوز پایین روز 15	دوز پایین روز 25	دوز پایین روز 45	کنترل
درصد لقاح	7/14 [a] ±87/50	13/96 [b] ±70/50	12/87 [b] ±40/50	11/35 [a] ±76/25	9/32 [a] ±77/75	11/90 [b] ±61/50	7/41 [a]±88/75
درصد بلاستوسیستها	3/87 [a] ±60/75	13/30 [a] ±59/75	7/25 [b] ±24/00	7/63 [a] ±62/25	3/59 [a] ±58/25	11/11 [b] ±27/75	6/21 [a]±65/00

داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار بوده و در هر ردیف میانگین‌ها با حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌داری می‌باشند($p<0/05$)

بحث

تقریباً 20 درصد زوج‌های جوان از ناباروری خود در طول زندگی رنج می‌برند که 50 درصد عوامل ناباروری در این زوج‌ها مربوط به مردان می‌باشد که عوامل مختلفی در این مردان نابارور دخیل است که در اکثر موارد علت ناباروری مربوط به کیفیت اسپرم می‌باشد(18). عوامل بسیاری باعث ناباروری در مردان و زنان می‌شود که این عوامل می‌تواند عوامل محیطی از قبیل مواد شیمیایی و دارویی باشد که در طول مرحله زندگی به اجبار این مواد

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 19:21 +0330 on Saturday November 18th 2017

وارد بدن انسان می‌گردد(19). بسیاری از سموم کشاورزی از جمله سم دیازینون و ایمیدوکلوپراید که برای از بین بردن آفات کشاورزی در مزارع استفاده می‌شوند باعث ایجاد یک سری تغییرات پاتولوژیک در بافت بیضه می‌گردند از جمله آتروفی بافت بیضه، ادم بافت بینابینی بیضه، کاهش سلول‌های لیدیک (که ترشح کننده هورمون تستوسترون می‌باشند)، افزایش سلول‌های ایمنی در بافت بینابینی بیضه و کاهش ضریب تمایز در لوله‌های اسپرم ساز که همه این موارد می‌تواند نقش مهمی در ناباروری داشته باشد(20، 21). اثر بسیاری از مواد از جمله الکل، نیکوتین و داروها از جمله سیپرومترین و کولشی سین فوکسیم و دیلتیازیم بر روی بافت بیضه، اسپرم و روند اسپرماتوژنز مشخص شده است که این مواد باعث تغییرات پاتولوژیک در بافت بیضه شده و اختلال در روند اسپرماتوژنز به وجود می‌آورند هم‌چنین باعث کاهش طول عمر، کاهش حرکت و تعداد اسپرم‌ها می‌شوند که این اختلالات می‌توانند منجر به کاهش باروری گردند(28-22). هم‌چنین مطالعات وسیعی بر روی اثر برخی از عناصر از جمله روی صورت گرفته و نشان داده شده که در صورت کاهش روی در مایع منی تعداد کل اسپرم‌ها هم‌چنین حرکت اسپرم‌ها کم می‌شود(29). از طرف دیگر یک سری از مواد از جمله استیل سالسیلات باعث افزایش حرکت اسپرم‌ها شده ولی تعداد کل اسپرم‌ها را کاهش می‌دهد. در برخی از مطالعات صورت گرفته نشان داده شده است که در فصل تابستان در کشاورزان میزان اسپرم‌ها نسبت به فصل زمستان کاهش پیدا می‌کند که علت آن را به استفاده از سموم کشاورزی در فصل تابستان که به وفور از آنها استفاده می‌شود مربوط می‌دانند(6). مطالعه‌ای که توسط کنیوالد و همکاران انجام شده، نشان داده است که سم آترازین باعث کاهش در تعداد اسپرم‌های اپیدیدیمی و کاهش تحرک اسپرم‌ها می گردد هم‌چنین نشان داده‌اند که سلول‌های لیدیک به شکل نامنظم در بافت بینابینی بیضه دیده می‌شوند(30). اما تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد اثر آترازین بر روی باروری آزمایشگاهی و روند رشد جنین‌ها صورت نگرفته است بنابراین لازم بود که مطالعه دقیقی در مورد اثر این سم بر روی رشد جنین‌ها صورت گیرد. این مطالعه نشان داد که آترازین می‌تواند در دوز بالا در روزهای 25 و 45 و در دوز پایین در روز 45 باعث کاهش در تعداد اسپرم‌ها شود. هم‌چنین معلوم شد که درصد تحرک پیشرونده اسپرم‌ها در دوز بالا در روز 45 کاهش یافته است. در ضمن تعداد اسپرم‌های فاقد تحرک در دوز بالا در روز 45 نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. مطالعات نشان داده است که درصد اسپرم‌هایی با کروماتین غیر طبیعی و DNA غیر طبیعی در افراد نابارور نسبت به افراد بارور بسیار بیشتر و قابل توجه می‌باشد(31). ایونسون و همکاران نشان داد که اگر ناهنجاری‌های مربوط به DNA در بیش از 30 درصد اسپرم‌ها مشاهده شود فرد مورد نظر به عنوان نمونه نابارور محسوب خواهد شد(32). در مطالعه ما معلوم شد که سم آترازین می‌تواند باعث افزایش اسپرم‌های نا بالغ در روزهای 25 و 45 دوز بالا و در روز 45 در دوز پایین شود. هم‌چنین مشخص شد که در دوز بالا در روز 45 تعداد اسپرم‌ها با کروماتین آسیب دیده نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. همچنین مشخص شد که این سم می‌تواند باعث کاهش درصد لقاح در روز 25 و 45 در دوز بالا و روز 45 در دوز پایین شود هم‌چنین درصد بلاستوسیست‌ها در روز 45 در دوز بالا و پایین کاهش نشان داد.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که سم آترازین می‌تواند با کاهش تعداد و تحرک اسپرم‌ها و افزایش اسپرم‌های نابالغ و اسپرم‌ها با DNA آسیب دیده باعث کاهش درصد لقاح و توان باروری در رت گردد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق قسمتی از یک طرح تحقیقاتی با کد 86/ د/ 014 و تحت عنوان بررسی اثر داروی آترازین بر روی میزان باروری و تغییرات بافت شناختی دستگاه تناسلی در موش رت نر بوده است. لذا هزینه‌های مالی آن از محل

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 19:21 +0330 on Saturday November 18th 2017

طرح توسط معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه تامین شده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

1. Thonneau P. Fecundity and environment a new challenge. Contracept. Fertil Sex. 1993; 21:639-41.
2. Spira A, Multigner L. Environmental factors and male infertility. Hum Reprod. 1998; 13: 2041-2.
3. Heindel JJ, Chapin RE, Gulati DK, George JD, Price CJ, Marr MC, et al. Assessment of the reproductive and developmental toxicity of pesticide/fertilizer mixtures based on confirmed pesticide contamination in California and Iowa groundwater. Toxicological Sciences. 1994; 22(4): 605-21.
4. Lu FC. Basic Toxicology: Fundamentals, Target Organs and Risk Assessment, 2th ed: Hemisphere Publishing Corporation, Washington. 1991.p. 277-91.
5. Sarabia L, Maurer I, Bustos-Obregon E. Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on the mouse testis. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2009;72(3):938-42.
6. Jorgenson JL. Aldrin and dieldrin: a review of research on their production, environmental deposition and fate, bioaccumulation, toxicology, and epidemiology in the United States. Environmental health perspectives. 2001; 109(Suppl 1):113-9.
7. Bethsass J, Colangelo A. European Union bans atrazine, while the United States negotiates continued use. International journal of occupational and environmental health. 2006; 12(3): 260-7.
8. WHO IPCS. Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification. WHO, Geneva.1996.
9. Kniewald J, Osredečki V, Gojmerac T, Zechner V, Kniewald Z. Effect of s-triazine compounds on testosterone metabolism in the rat prostate. Journal of Applied Toxicology. 2006; 15(3):215-8.
10. Peruzović M, Kniewald J, Capkun V, Milković K. Effect of atrazine ingested prior to mating on rat females and their offspring. Acta Physiologica Hungarica. 1995;83(1):79-89.
11. Šimić B, Kniewald Z, Davies JE, Kniewald J. Reversibility of the inhibitory effect of atrazine and lindane on cytosol 5α-Dihydrotestosterone receptor complex formation in rat prostate. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 1991; 46(1):92-9.
12. Babić-Gojmerac T, Kniewald Z, Kniewald J. Testosterone metabolism in neuroendocrine organs in male rats under atrazine and deethylatrazine influence. Journal of steroid biochemistry. 1989;33(1):141-6.
13. Kniewald J, Peruzović M, Gojmerac T, Milković K, Kniewald Z. Indirect influence of s-triazines on rat gonadotropic mechanism at early postnatal period. Journal of steroid biochemistry. 1987;27(4):1095-100.
14. Kniewald J, Kniewald Z. Studies on neuroendocrine effects of atrazine in male rats. The Triazine Research Meeting: Mode of Action. Hilton Head Island.1997.
15. World Health organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction.3th edition. Newyork: Cambridge university press.1999.
16. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M.Relation Between Different Human Sperm Nuclear Maturity Tests and In Vitro Fertilization. Journal of assisted reproduction and genetics. 2001;18(4):221-7.
17. Mark AS, Steven HW, Craig LF. The laboratory rat. 2nd Edition. Elsevier.2006. p.166-90.
18. Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. Fertility and sterility. 2001; 75(2):237-48.
19. Schlegel PN, Chang T, Marshall F. Antibiotics: potential hazards to male fertility. Fertility and sterility. 1991;55(2):235-42.
20. Najafi GH, Salami S, Karimi A. The effect of Diazinon on testicular tissue in adult male rat: A Histophatological study. Urmia Medical Journal. 2010; 20(4):313-9.[Persian]
21. Najafi GH, Mazdak r, Hoshyar A, Simineh SH, Feyzi S. The effect of chronic Exposure

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 19:21 +0330 on Saturday November 18th 2017

with Imidocloprid insecticide on fertility in mature male rat. 2010; 4(1): 9-16.[Persian]
22. Dare W, Noronha C, Kusemiju O, Okanlawon O. The effect of ethanol on spermatogenesis and fertility in male Sprague-Dawley rats pretreated with acetylsalicylic acid. The Nigerian postgraduate medical journal. 2002; 9(4):194-8.
23. El-Sokkary GH, Cuzzocrea S, Reiter RJ. Effect of chronic nicotine administration on the rat lung and liver: Beneficial role of melatonin. Toxicology. 2007; 239(1):60-7.
24. Reddy A, Sood A, Rust PF, Busby JE, Mathure RS, Mathur S. The effect on nicotinine on in vitro sperm motion characteristics. J Assist Repro Genet. 1995; 12(3): 217-23.
25. Yousef M, El-Demerdash F, Al-Salhen K. Protective role of isoflavones against the toxic effect of cypermethrin on semen quality and testosterone levels of rabbits. Journal of Environmental Science and Health, Part B. 2003; 38(4):463-78.
26. Ben-Chetrit A, Ben-Chetrit E, Nitzan R, Ron M. Colchicine inhibits spermatozoal motility in vitro. Int J Fertil Menopausal Stud. 1993; 38(5):301-4.
27. Zhan N, Wang S, Wang X. Effect of phoxim on sperm production and motility of rat. Weisheng Yan Jiu. 2000; 30: 29(1):4-6.
28. Wood BL, Doncel GF, Reddy PR, Sokal DC. Effect of diltiazem and methylene blue on human sperm motility, viability and cervical mucus penetration: potential use as vas irrigants at the time of vasectomy. Contraception. 2003; 67(3): 241-5.
29. Colon J, Ginsburg F, Lessing J, Schoenfeld C, Goldsmith L, Amelar R, et al. The effect of relaxin and prostaglandin E2 on the motility of human spermatozoa. Fertil Steril. 1986; 46(6): 1133-9.
30. Kniewald J, Jakominić M, Tomljenović A, Šimić B, Romac P, Vranešić Đ, et al. Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine. Journal of Applied Toxicology. 2000; 20(1):61-8.
31. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. Journal of Andrology. 2000; 21(1):33-44.
32. Evenson D, Jost L, Marshall D, Zinaman M, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. Human Reproduction. 1999; 14(4):1039-49.