

تأثیر حشره‌کش اسپیروترامات بر استرس اکسیداتیو و هیستوشیمی بافت بیضه در

موش‌های سوری

قدرت عبادی مناسب*



ایران، تهران، دانشگاه فرهنگیان، گروه آموزش زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۱۹

چکیده

یکی از مهمترین چالش‌های انسان امروزی، آلودگی محیط زیست از طریق سموم کشاورزی بخصوص حشره‌کش‌ها است. اسپیروترامات حشره‌کشی جدیدی است که توسط کشاورزان بطور گسترده استفاده می‌شود و تا به حال درباره عوارض جانبی آنها بر روی سیستم تولیدمثلی به خوبی مطالعه نشده است. هدف تحقیق حاضر بررسی تأثیر اسپیروترامات بر روی استرس اکسیداتیو و تغییرات هیستوشیمیایی بافت بیضه در موش‌های سوری بود. در این مطالعه، تعداد ۲۴ موش سوری نر بالغ، با محدوده وزن بدنی ۲۴-۳۲ گرم، از حیوان‌خانه دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه و مورد مطالعه قرار گرفت. موش‌ها به طور تصادفی به سه گروه کنترل، تجربی ۱ و تجربی ۲ تقسیم شدند. هر گروه شامل ۸ موش بود. موش‌های گروه تجربی ۱ و ۲ به ترتیب اسپیروترامات را به مقدار ۲/۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و گروه کنترل به همان مقدار آب مقطر به مدت ۴۵ روز از طریق دهانی بوسیله گاواژ دریافت کردند. بعد از این مدت موش‌ها بیهوش و مقاطع میکروسکوپی تهیه شد. میزان استرس اکسیداتیو، ذخایر هیدرات کربن، ذخایر چربی سیتوپلاسمی و میزان التهاب در بافت بیضه بررسی شد. یافته‌های کیفی هیستوشیمی با استفاده از نرم افزار-Imag به داده‌های کمی تبدیل شد. نتایج تحقیق نشان داد که اسپیروترامات موجب کاهش ذخایر کربوهیدرات، TAC و TTM، افزایش ذخایر چربی، آنزیم آلکالین فسفاتاز، NO و MDA گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه کنترل شد. بنابراین حشره‌کش اسپیروترامات با آسیب سلول‌های لوله اسپرم‌ساز، همچنین با مهار فعالیت استیل کوآنزیم-آ، موجب افزایش استرس اکسیداتیو و تغییرات هیستوشیمی در بافت بیضه موش شده است.

واژه‌های کلیدی: هیستوشیمیایی، استرس اکسیداتیو، اسپیروترامات، بیضه، موش سوری

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: ebadimanas@gmail.com

مقدمه

اسپیروسیکلیک است که منحصراً توسط شرکت بایر آلمان با نام تجاری مونتو ساخته شده و تنها حشره‌کش برگی است (۵).

تحقیقات نشان داده اسپیروترامات دارای یک حالت عمل جدید و منحصر به فرد است که به عنوان بازدارنده استیل کوآکربوکسیلاز یا بازدارنده بیوستنز لپید حشرات عمل می‌کند. این حشره‌کش یک سموم کننده خوراکی است و عمدتاً روی حشرات نابالغ فعال است (۴). این ترکیب بعد

امروزه یکی از تهدید کنندگان اصلی زندگی انسان‌ها روی کره زمین، آلودگی محیط زیست بوسیله مواد شیمیایی است که طی سالیان گذشته توسط انسان تولید و به دلیل استفاده بی‌رویه و سم پاشی‌های طولانی مدت، آفات نسبت به آنها مقاوم شده و روز به روز رده‌های جدید و مخربتر توسط کارخانجات سازنده تولید می‌شود. عوارض جانبی تعداد کمی از آنها مورد مطالعه قرار گرفته است. از مهمترین مواد شیمیایی پرمصرف در محیط زیست، حشره‌کش‌ها هستند (۱۹). اسپیروترامات یک حشره‌کش مشتق اسید تترامیک

وزن بدن هر موش حدود ۳۲-۲۴ گرم بود که از نظر ظاهر سالم بودند. قبل از شروع آزمایش و به منظور سازش با محیط، موش‌ها یک هفته در آزمایشگاه با شرایط استاندارد نگهداری شدند. موش‌ها از نظر دسترسی به آب و غذا محدودیتی نداشتند. دمای اتاق در محدوده ۲۰-۲۳ درجه سانتیگراد با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود که تمام شرایط تا پایان آزمایش به شدت کنترل می‌شد. موش‌ها به طور تصادفی به سه گروه ۸ تایی شامل گروه کنترل، تجربی ۱ و تجربی ۲ تقسیم شدند. سم اسپروترامات در آب مقطر حل شد. موش‌های گروه تجربی ۱ به مقدار ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن و گروه تجربی ۲ به مقدار ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۴۵ روز از طریق دهان بوسیله گاواژ دریافت کردند. موش‌های گروه کنترل به همان مقدار آب مقطر در همان مدت دریافت کردند. تمامی مراحل این پژوهش تحت نظارت کمیته حمایت از حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی ارومیه و با کسب مجوز از کمیته اخلاقی دانشگاه ارومیه به شماره ۵۰/۲۰۱/۵۰۹/۲۴۰ انجام گرفت.

در پایان دوره، موش‌ها با دی اتیل اتر بیهوش و برای بررسی میزان ذخایر هیدرات‌های کربن و چربی بافت بیضه، تشریح و بیضه به همراه ضمائم‌ها از هر موش خارج و جهت تثبیت در محلول فرمالین قرار گرفت سپس بطور کامل به داخل پارافین انتقال داده شدند. سپس از بافت بیضه، برش‌های ۶ میکرومتری زده شد.

سنجش هیستوشیمیایی: برای بررسی بافت‌ها از میکروسکوپ نوری با درشتمایی $\times 400$ و $\times 1000$ استفاده شد. به منظور بررسی میزان چربی‌های غیراشباع از رنگ آمیزی سودان بلاک - B و برای بررسی ذخایر گلیکوژن و مواد حاوی کربوهیدرات در بافت‌ها از واکنش پاس (PAS: Periodic Acid Schiff) همچنین از فعالیت آلکالین فسفاتاز جهت ارزیابی میزان التهاب در بافت بیضه استفاده شد. برای به دست آوردن داده‌های آماری قابل مقایسه از

از ورود به بافت گیاهی هیدرولیز شده و به صورت الکلی در آمده و تمام ویژگی‌های لازم یک حشره‌کش سیستمیک در آوندهای آبکش را دارا خواهد بود (۲۰) به همین دلیل تاثیر این آفت‌کش روی آفات مکنده بصورت تاخیری گزارش شده است (۳). مالینگر و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کرده ترکیبات مشتق شده از واحد ساختاری اسید ترامیک دارای فعالیت‌های بیولوژیکی در طیف گسترده‌ای هستند. آنتی بیوتیک تیراندامایسین A و فیتوتوکسین اسید تنوازونیک نمونه‌هایی از این نوع ترکیبات موجود در طبیعت هستند (۱۸). کفشگیری و همکاران (۱۳۹۵) با بررسی اثر حشره‌کش موونتو بر سیستم تولید مثلی ماده موش کوچک سفید آزمایشگاه نشان داد که موونتو موجب تغییر سطح هورمون‌های جنسی و ایجاد تغییر در ساختار فولیکول‌های تخمدانی و القاء آسیب به سیستم تولیدمثلی ماده می‌شود (۱۵).

از طرفی تحقیقات پیشین نشان داده کربوهیدرات‌های سیتوپلاسمی بخصوص گلوکز منبع اصلی برای تأمین انرژی مورد نیاز برای اکثر فعالیت‌های زیستی هستند. هر گونه تغییرات در متابولیسم آنها می‌تواند بر تقسیم سلولی و فعالیت بیولوژیکی آنها تأثیر گذاشته و به نوبه خود می‌تواند منجر به اختلال در اسپرماتوزن شود (۱۰). تاکنون مطالعه زیادی درباره عوارض جانبی این سم انجام گرفته ولی تحقیقی درباره تاثیر اسپروترامات بر میزان استرس اکسیداتیو و ذخایر مولکول‌های تأمین کننده انرژی سلول، صورت نگرفته است. بنابراین هدف این تحقیق بررسی تاثیر حشره‌کش اسپروترامات بر میزان استرس اکسیداتیو بافت بیضه، میزان ذخایر کربوهیدرات‌های سیتوپلاسمی، اسیدهای چرب غیراشباع به عنوان منبع انرژی جایگزین برای کربوهیدرات‌ها و آلکالین فسفات‌های بافتی به عنوان بیومارکر برای التهاب در لوله‌های اسپرم‌ساز بود.

مواد و روشها

در این کار پژوهشی ۲۴ موش سوری نر بالغ استفاده شد.

بررسی‌های هیستوشیمیایی براساس مطالعات پیشین (۱۴)، ابتدا از نمونه‌های گروه‌های مختلف در زیر میکروسکوپ عکس تهیه، سپس عکس‌ها در نرم افزار J-Imag باز شده و شدت رنگ آمیزی عکس با استفاده از نرم افزار به داده کمی تبدیل و بصورت میانگین مقایسه شدند.

اندازه‌گیری ظرفیت کل آنتی اکسیدان: برای اندازه‌گیری میزان تاثیر اسپیروترامات بر روی استرس اکسیداتیو، ظرفیت کل آنتی اکسیدان (Total Antioxidant Capacity (TAC در همه گروه‌ها اندازه‌گیری شد. با سنجش کاهش قدرت احیاء کنندگی فریک (Ferric Antioxidant Power (FRAP)، میزان آنتی اکسیدانی کل بافت بیضه تعیین می‌شود (۵). در این روش ابتدا با استات بافر، PH کاهش، سپس اثر احیاء شونده‌گی کمپلکس FeIII-TPTZ به فرم فروس مورد ارزیابی قرار گرفت. به این صورت که کمپلکس در مجاورت استات بافر رنگ آبی ایجاد می‌کند. به ۳ میلی لیتر معرف FRAP، 100 میکرولیتر از محلول هموژن بافت اضافه و به مدت ۷-۱۰ دقیقه انکوبه گردید. جذب کمپلکس آبی رنگ در ۵۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۷).

اندازه‌گیری تیول تام: برای اندازه‌گیری میزان مولکول‌های تیول (Total Thiol Molecules (TTM)، از روش دیلارد استفاده شد. در این روش به ۰/۶ میلی لیتر بافر EDTA مقدار ۰/۲ میلی لیتر سرم اضافه شد، سپس DTNB به مقدار ۴۰ میکرولیتر اضافه گردید. سپس با اضافه کردن متانل ظرفیت نهایی به ۴ میلی لیتر رسانده و انکوبه شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ و میزان جذب مایع رویی در ۴۱۲ nm اندازه‌گیری شد (۱۳).

اندازه‌گیری مالون دی آلدئید: مبنای اندازه‌گیری Malondialdehyde (MDA) واکنش تیوباربیتوریک اسید است که بوسیله Niehaus و همکاران انجام شده است. در این روش ۰/۳-۰/۴ بافت بیضه در داخل کلریدپتاسیم سرد شده، هموژنیزه، بعد به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ g سانتریفوژ شد. سپس ۳ میلی لیتر فسفوریک اسید یک درصد

با ۰/۵ میلی لیتر از ماده رویی مخلوط و به ترکیب حاصل ۲ میلی لیتر از ۶/۷ گرم لیتر تیوباربیتوریک اضافه شد. نمونه‌ها در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه نگهداری شدند. بعد از سرد شدن ۳ میلی لیتر n- بوتانول اضافه و با دور ۳۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مقدار جذب ماده رویی در ۵۳۲ نانومتر بوسیله اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و مقدار ماده مالون دی آلدئید تعیین شد. مقدار مالون دی آلدئید در واحد نانو مول در میلی‌گرم در پروتئین نمونه است (۲۲).

اندازه‌گیری نیتریک اکسید: مقدار نیتریک اکسید (Nitric Oxide (NO بیضه براساس واکنش گریس اندازه‌گیری شد. در این روش نیتریک اکسید به نیتريت تبدیل و در محیط اسیدی نیتريت به HNO₂ تغییر می‌یابد. ترکیب حاصل در واکنش با سولفانامید، دیازینوم ایجاد می‌کند. که با LN-(1- ethylenediamine.2HC (naphthyl) واکنش داده و نمک دیازینوم تولید می‌شود. ترکیب حاصل با جذب طول موج ۵۴۰ نانومتر قابل شناسایی است. مقدار نیتریک اکسید با نانومول بر میلی‌گرم پروتئین در نمونه اندازه‌گیری می‌شود (۱۱).

آنالیز آماری

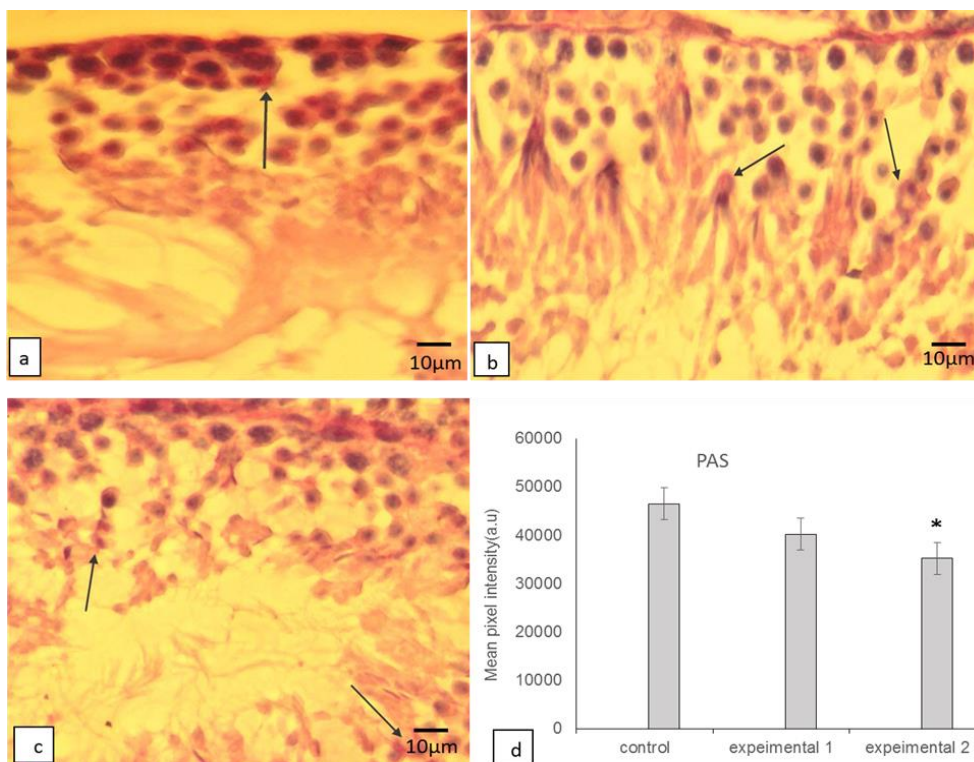
داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفتند. داده‌ها به صورت Mean \pm SE ارائه شدند. جهت مقایسه میانگین‌ها در گروه‌های تحت مطالعه از آزمون ANOVA استفاده شد و در مواردی که $p < 0/05$ بود معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج

اثر اسپیروترامات بر میزان تراکم کربوهیدرات‌های سیتوپلاسمی: بررسی نمونه‌ها بوسیله میکروسکوپ نوری، نشان داد که در گروه کنترل، واکنش PAS مثبت شدید در سلول‌های لیدیک و همچنین در سلول‌های سری اسپرما توژنیک مشاهده شد (شکل ۱. a). در گروه تجربی ۱،

تجربی ۲، واکنش PAS در سلول‌های لیدیگ و اسپرماتوزنز شدیداً ضعیف بود (جدول ۱، شکل ۱. c).

در سلول‌های لیدیگ و سلول‌های سری اسپرماتوزنز واکنش PAS مثبت نسبتاً ضعیف مشاهده شد (شکل ۱. b). در گروه



شکل ۱- تصویر بافت بیضه موش نر با درشت‌نمایی $\times 400$ قابل مشاهده است: (a) گروه کنترل که در آن تمام رده‌های سلولی نسبت به رنگ آمیزی پاس واکنش مثبت شدید نشان داده‌اند. (b) : گروه تجربی ۱، که در آن رده‌های سلولی نسبت به رنگ آمیزی پاس واکنش متوسط نشان داده است. (c): گروه تجربی ۲ که در آن رده‌های سلولی نسبت به پاس واکنش خیلی ضعیفی نشان داده است. (d): مقایسه میانگین شدت رنگ آمیزی پاس در گروه‌های مختلف است. وجود علامت ستاره (*) در بالای هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($p < 0/05$) نسبت به گروه کنترل است.

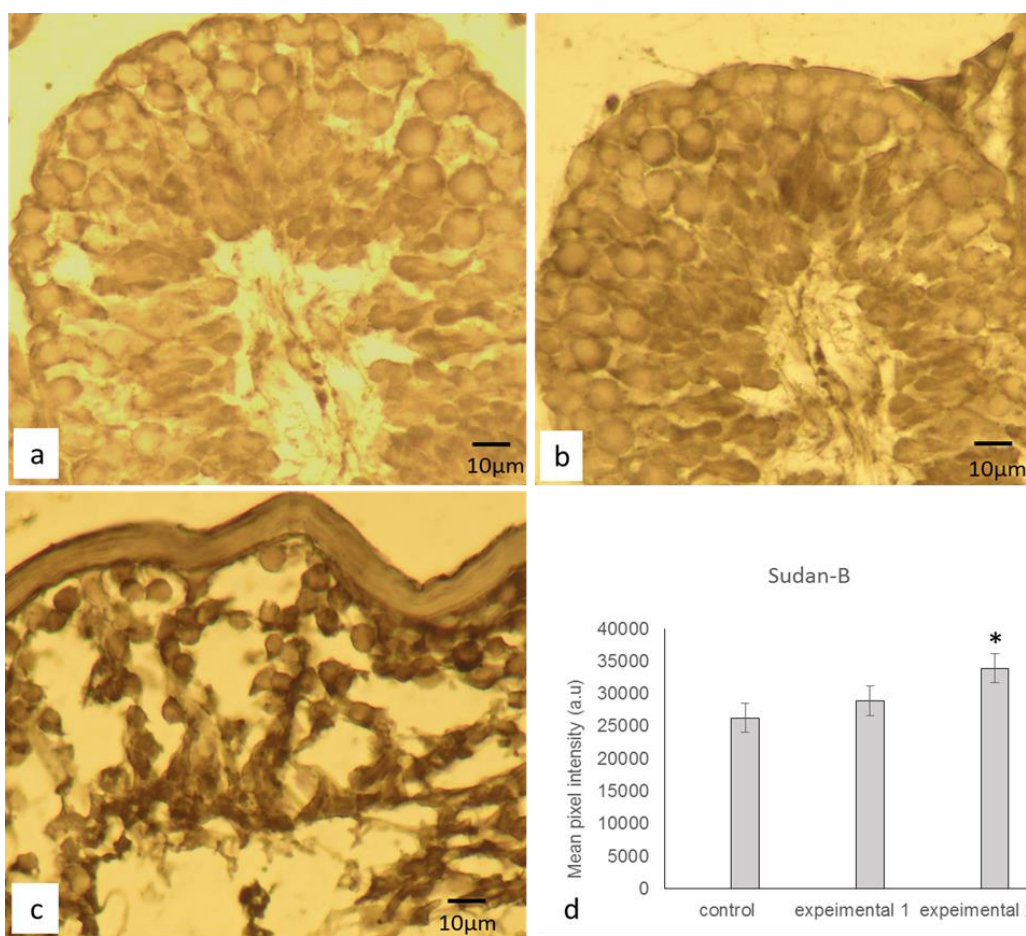
همچنین در گروه تجربی ۲، سودان بلاک - B در سلول‌های لیدیگ شدیداً مثبت و در سلول‌های سرتولی و اسپرماتید بصورت ضعیف مثبت مشاهده شد. دانه‌های سودان بلاک در اکثر سلول‌های سری اسپرماتوزوئید و سرتولی مشاهده گردید. در بعضی نمونه‌ها به علت تغییرات شدید تحلیل در بافت لوله‌های اسپرم ساز آرایش سلولی به هم خورده ولی با این وجود در بعضی از سلول‌ها واکنش سودان بلاک مثبت در لوله‌های اسپرم‌ساز مشاهده شد ولی باز واکنش در سلول‌های لیدیگ خیلی شدید بود (جدول ۱، شکل ۲. c).

اثر اسپروترامات میزان بر تراکم چربی‌های غیر اشباع: مطالعه هیستوشیمیایی مربوط به بررسی تراکم لیپیدهای سیتوپلاسمی با استفاده از روش سودان بلاک - B نشان داد در گروه کنترل واکنش سودان بلاک - B در جمعیت سلول‌های لیدیگ، سلول‌های سرتولی و سلول‌های اسپرماتید بصورت ضعیف مشاهده شد (شکل ۲. a). در گروه تجربی ۱، رنگ آمیزی سودان بلاک - B در جمعیت سلول‌های لیدیگ بطور متوسط و سلول‌های سرتولی و اسپرماتید بصورت ضعیف مثبت بودند (شکل ۲. b).

جدول ۱- مقایسه میانگین شدت رنگ آمیزی پاس، سودان-بلاک B و آلکالین فسفاتاز محاسبه شده با نرم افزار Imag-J در گروه‌های مختلف موش‌های سوری تحت تاثیر اسپیروترامات (Mean \pm SE).

گروه‌ها	PAS(Pixel)	Sudan Black B(Pixel)	ALP (Pixel)
کنترل	۴۶۵۰۰ \pm ۵۶ ^a	۲۶۳۸۲ \pm ۱۳ ^a	۳۲۸۴۱ \pm ۷۷ ^a
تجربی ۱	۴۰۲۰۱ \pm ۶۲ ^a	۲۸۸۹۴ \pm ۵۱ ^a	۳۷۳۴۵ \pm ۸۷ ^a
تجربی ۲	۳۵۳۲۱ \pm ۴۶ ^b	۳۳۹۲۶ \pm ۱۴ ^b	۴۵۶۷۹ \pm ۱۱۶ ^b

حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار ($p < 0/05$) بین گروه کنترل و گروه‌های تجربی در هر ستون می‌باشند.



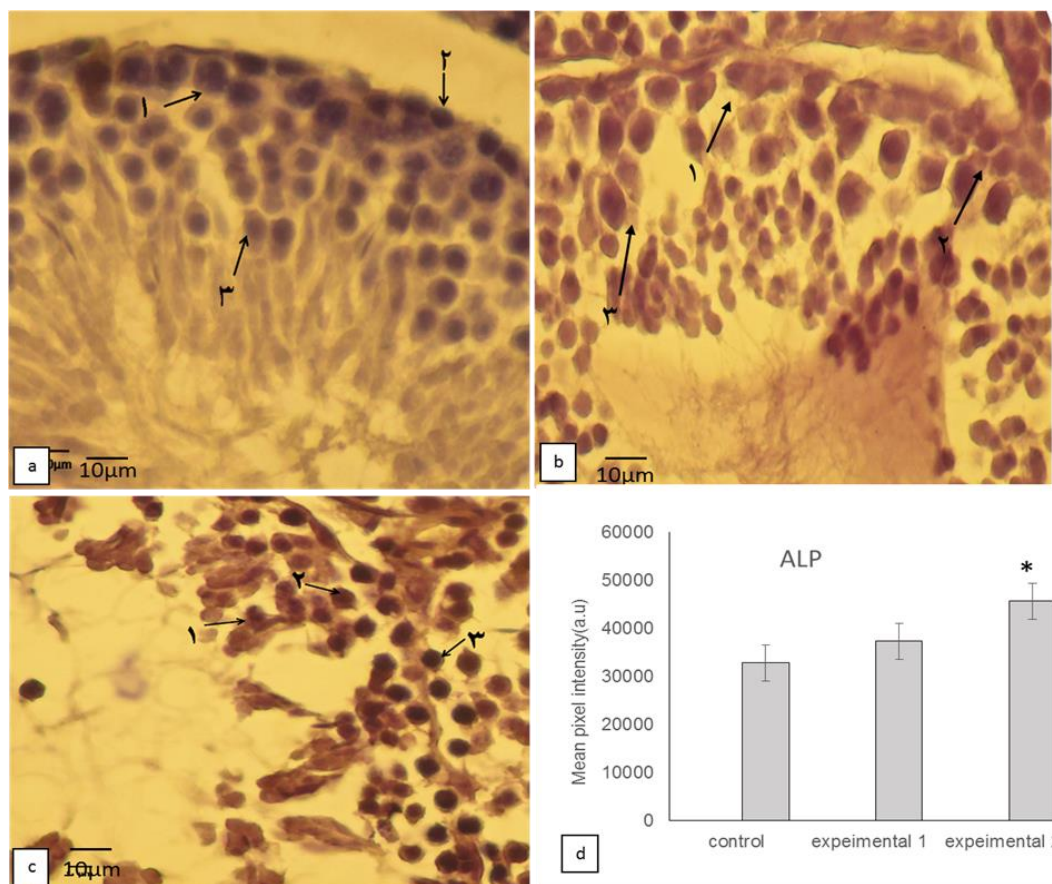
شکل ۲- تصویر بافت بیضه موش نر با درشت‌نمایی $\times 400$ قابل مشاهده است. (a): گروه کنترل که در آن رده‌های سلول‌های زاینده نسبت به رنگ آمیزی سودان - بلاک B منفی هستند. (b): گروه تجربی ۱، که در آن رده‌های سلول‌های زاینده نسبت به رنگ آمیزی سودان - بلاک B بطور ضعیف مثبت هستند. (c): گروه تجربی ۲، که در آن رده‌های سلول‌های زاینده نسبت به رنگ آمیزی سودان - بلاک B بصورت شدیداً مثبت و با بهم ریختگی بافتی در اثر سم قابل مشاهده است. (d): مقایسه میانگین شدت رنگ آمیزی سودان بلاک B در گروه‌های مختلف است. وجود علامت ستاره (*) در بالای هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ($p < 0/05$) نسبت به گروه کنترل است.

میکروسکوپ نوری نشان داد که در گروه کنترل، واکنش آلکالین فسفاتاز در ساختارهای بافت بینابینی و لوله‌های

اثر اسپیروترامات بر میزان آلکالین فسفاتاز در سلول‌های لوله‌های اسپرم‌ساز: بررسی بافت بیضه موش با

ضعیف مشاهده شد (شکل ۳. b). به علاوه در گروه تجربی ۲، واکنش آلکالین فسفاتاز مثبت شدید بود (جدول ۱، شکل ۳. c).

اسپرم‌ساز شامل سلول‌های سری اسپرماتوژنز مخصوصاً اسپرماتوسیت مشاهده نشد (شکل ۳. a). در گروه تجربی ۱، در بعضی مناطق بافت بیضه واکنش آلکالین فسفاتاز بصورت



شکل ۳- تصویر بافت بیضه موش با درشت‌نمایی $\times 400$ قابل مشاهده است. (a) : گروه کنترل که در آن واکنش سلول‌های زاینده نسبت به رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز منفی است. ۱- اسپرماتوسیت نوع I، ۲- اسپرماتوگونی نوع B، ۳- اسپرماتید (b): گروه تجربی ۱، که در آن واکنش سلول‌های زاینده نسبت به رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز نسبتاً ضعیف و با سیتوپلاسم تیره است. ۱- اسپرماتوگونی نوع B، ۲- اسپرماتوسیت نوع I، ۳- اسپرماتید (c): گروه تجربی ۲، که در آن واکنش سلول‌های زاینده نسبت به رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز مثبت و با سیتوپلاسم تیره‌تر است. ۱- اسپرماتید، ۲- اسپرماتوسیت نوع I، ۳- اسپرماتوگونی نوع B (d): مقایسه میانگین شدت رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز در گروه‌های مختلف است. وجود علامت ستاره (*) در بالای هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($p < 0/05$) نسبت به گروه کنترل است.

به گروه کنترل بطور معنی‌داری ($p < 0/05$) کاهش یافته است. همچنین مقدار MDA و NO گروه‌های تجربی ۱ و ۲ نسبت به کنترل افزایش یافته که فقط در گروه تجربی ۲ معنی‌دار ($p < 0/05$) است (جدول ۲).

اثر اسپیروترامات بر روی استرس اکسیداتیو در بافت بیضه: یافته‌ها درباره اثر اسپیروترامات بر روی میزان استرس اکسیداتیو در بافت بیضه، مشخص کرد که مقدار TAC و TTM گروه تجربی ۱ در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته ولی معنی‌دار ($p > 0/05$) نیست. اما گروه تجربی ۲ نسبت

جدول ۲- مقایسه میانگین پارامترهای استرس اکسیداتیو در گروه‌های مختلف موش‌های کوچک سوری تحت تاثیر اسپیروتترامات (Mean \pm SE)

گروه‌ها	TAC (nMol/ml)	TTM (nMol/ml)	MDA (nMol/mg)	NO (nMol/mg)
کنترل	۱/۰ \pm ۰۲/۰۲۴ ^a	۰/۰ \pm ۴۶/۱۴ ^a	\pm ۲۲/۰ ۰/۱۱ ^a	\pm ۱۷/۰ ۰/۰۸ ^a
تجربی ۱	۰/۰ \pm ۸۹/۱۱ ^a	۰/۰ \pm ۳۷/۵۱ ^a	\pm ۵۱/۰ ۰/۱۳ ^a	\pm ۲۹/۰ ۰/۰۵ ^a
تجربی ۲	\pm ۵۲/۰ ۰/۲۱ ^b	\pm ۱۸/۰ ۰/۱۴ ^b	\pm ۹۵/۰ ۰/۰۴ ^b	\pm ۷۲/۰ ۰/۰۴ ^b

حروف غیریکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار ($p < ۰/۰۵$) بین گروه کنترل و گروه‌های تجربی در هر ستون می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

شده و اثرات زیان‌باری را روی باروری و فعالیت بیولوژیکی موش‌ها نر داشته است. همچنین حاج صمدی و همکاران (۱۳۹۵) نتیجه گرفته حشره کش اسپیرودیکلوفن (انودور) موجب کاهش ذخایر کربوهیدراتی در حشره سن گندم می‌شود که هردوی این نتایج در راستای یافته‌های تحقیق حاضر است (۲۰۷).

برای شناسایی منبع انرژی جایگزین هیدرات کربن، از رنگ آمیزی سودان بلاک - B استفاده شد. نتایج نشان داد که گروه تجربی ۱ به رنگ آمیزی سودان بلاک B واکنش متوسط و گروه تجربی ۲ واکنش شدیدی را نشان داد که دلیل آن وجود مقادیر زیادی از اسیدهای چرب غیراشباع در درون سیتوپلاسم سلول‌های زاینده لوله متعاقب استفاده از حشره‌کش اسپیروتترامات است. بنابراین این گونه می‌توان استنباط نمود که این سلول‌ها بعد از تاثیر اسپیروتترامات بجای استفاده از گلوکز، از ذخایر چربی خود برای تامین انرژی استفاده کرده در نتیجه میزان اسیدهای چرب آزاد در سیتوپلاسم سلول افزایش و به رنگ سودان بلاک واکنش شدیدی را نشان داده است اما گروه کنترل واکنش منفی نسبت به سودان بلاک - B داشته است که دلیل آن سالم بودن غشای سلول در گروه کنترل و انتقال درست گلوکز به درون سلول به عنوان منبع اصلی تامین انرژی و عدم نیاز به منابع دیگر مثل اسیدهای چرب غیراشباع داخل سلولی می‌باشند (۱۶). اسوردراپ و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کرده که اسپیروتترامات در موش‌های رت موجب کاهش وزن، اختلال در هورمون‌های تیروئیدی، مغز و تیموس و سیستم

یکی از مهمترین آلودکننده‌های محیط زیست حشره‌کش‌ها هستند که عوارض جانبی آنها بر روی انسان برکسی پوشیده نیست. اسپیروتترامات هم حشره‌کش جدیدی است که برای کنترل آفات در کشاورزی بطور گسترده استفاده می‌شود. این حشره‌کش با مهار فعالیت آنزیم استیل کوانزیم - آ، موجب اختلال در چرخه تولید انرژی و کاهش بیوسنتز چربی‌ها در سلول می‌شود (۲۱). در این مطالعه، هدف بررسی تاثیر سم اسپیروتترامات روی استرس اکسیداتیو، میزان ذخایر کربوهیدرات، اسیدهای چرب آزاد و میزان آسیب بافت بیضه بود.

نتایج تحقیق نشان داد که سلول‌های سه ردیف اول لوله یعنی سلول‌های زاینده در موش‌های گروه تجربی ۱ در برابر رنگ آمیزی پاس واکنش ضعیفی را نشان داد و این عارضه با گذشت زمان و بالا رفتن دوز یعنی در گروه تجربی ۲ شدیداً ضعیف بود. دلیل احتمالی آن کاهش ذخایر هیدرات‌های کربن در سیتوپلاسم سلول در اثر سم اسپیروتترامات است. بنا به یافته‌های قبلی گلوکز مهمترین منبع انرژی در سلول‌هایی است که تقسیم میتوزی بالایی دارند و از طرفی انتقال دهنده گلوکز مهمترین منبع حمل گلوکز به درون لوله‌های اسپرم‌ساز به شمار می‌رود (۹) لذا آسیب وارده به پروتئین انتقال دهنده گلوکز بوسیله اسپیروتترامات می‌تواند علت این امر باشد. اچچری و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کرده که حشره‌کش اسپیروتترامات در موش‌های نر در دوزهای بالا باعث القاء تغییرات مورفولوژیک روی اسپرم‌ها

تولیدمثلی می‌شود که این نتایج همسو با نتایج این تحقیق است (۲۳).

آنزیم آلکالین فسفاتاز نقش مهمی در فرآیندهای سلولی دارد. آسیب غشاء سلول باعث آزاد شدن این آنزیم در داخل سلول و نهایتاً در سرم می‌گردد. بنابراین، اندازه‌گیری آنزیم آلکالین فسفاتاز به عنوان یک شاخص برای تغییرات بافت بیضه استفاده می‌گردد (۱۲). نتایج تحقیق نشان داد در گروه تجربی ۱، سلول‌های لیدیگ، سلول‌های سرتولی و سلول‌های ژرمینال از هم گسیخته، واکنش مثبتی را نسبت به رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز نشان دادند که این واکنش‌ها در گروه تجربی ۲ بسیار شدیدتر بود. بطوری که سلول‌های بیشتری نسبت به رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز واکنش نشان داده است. می‌توان استدلال کرد که در اثر سم اسپیروتترامات غشاء سلول‌های لوله‌های اسپرم‌ساز آسیب دیده و در اثر آن آنزیم آلکالین فسفاتاز به داخل سلول آزاد شده است این یافته هم جهت با نتایج فالكون اتچوری و همکاران (۲۰۱۳) است. فالكون اتچوری و همکاران گزارش کرد که سم اسپیروتترامات باعث بروز التهاب بافتی در کبد شده و در نهایت موجب مرگ تعدادی از موش‌های رت شده است (۸).

نتایج مطالعه نشان داد که حشره‌کش اسپیروتترامات موجب کاهش مقدار TAC و TTM و بالعکس موجب افزایش NO و MDA گروه‌های تجربی درمقایسه با گروه کنترل شده است. می‌توان این طور استنباط کرد که سم اسپیروتترامات با آسیب غشای سلول‌های بافت بیضه باعث آزاد سازی

منابع

مولکول‌های رادیکال آزاد و در نتیجه موجب افزایش سطح گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) Reactive oxygen species شده است. افزایش ROS منجر به کاهش TAC و TTM و در نهایت کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از طریق القای ROS باعث افزایش سطح MDA و NO توسط سم اسپیروتترامات شده است. در راستای همین نتایج، وایتیناتان و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کرد، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، و گلوکاتیون ردوکتاز و گلوکاتیون پراکسیداز در بیضه‌ها به دنبال مسمومیت با حشره‌کش متوکسی کلر در موش‌های صحرایی نر کاهش می‌یابد. همچنین جادی و همکاران (۱۳۹۴) گزارش کرده حشره‌کش دیازینون، برخی پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون بچه ماهی را کاهش می‌دهد که همسو با یافته‌های این تحقیق است (۱).

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت حشره‌کش اسپیروتترامات با آسیب سلول‌های لوله اسپرم‌ساز، موجب آزاد سازی رادیکال‌های آزاد و افزایش استرس اکسیداتیو می‌شود. همچنین با اختلال در انتفال گلوکز به داخل سلول، سلول‌ها منبع انرژی خود را از هیدراتهای کربن به لپیدها تغییر می‌دهند.

سپاسگزاری

در پایان پژوهشگر بر خود لازم می‌داند از زحمات و همکاری‌های جناب آقای کریمی کارشناس محترم آزمایشگاه بافت و جنین‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه نهایت تشکر و قدردانی داشته باشند.

۲- حاج صمدی، ز، موحدی‌فاضل، مرتضی، کاوسی، اورنگ و فتوحی، ک، ۱۳۹۵. اثرات معکوس اسپیرودیکلوفن بر برخی از ذخایر انرژی در سن گندم (*Eurygaster integriceps* Put. (Hem. Scutelleridae). مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، (علمی)، ۲۹(۱)، ۲۶-۳۶.

۱- جادی، ی، موحدی‌نیا، ع، صفاهیه، ع، دژندیان، س و حلاجیان، ع، ۱۳۹۴. مطالعه اثرات تحت کشندگی آفت کش دیازینون بر برخی پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون بچه ماهی سیم دریای خزر. مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، (علمی)، ۲۸(۳)، ۲۷۴-۲۸۱.

3- Alston, DG., Drost, D., 2008. Onion Thrips (*Thrips tabaci*). Utah State University Extension and Utah Plant Pest Diagnostic Laboratory. 7 pp.

[http:// extension. usu.edu /files/ publications/ factsheet/ent-117-08pr. pdf.link](http://extension.usu.edu/files/publications/factsheet/ent-117-08pr.pdf).

- 4- Bell, JW ., 2013. Petition for a three-year extension of exclusive use data protection for spirotetramat as provided for under fifra section 3(c) (1) (F) (ii). Bayer Corp Science. 48 p.
- 5- Bretschneider, T., Fischer, R., & Nauen, R., 2007. Inhibitors of lipid synthesis (acetyl-CoA-carboxylase inhibitors). *Modern crop protection compounds*, 3, 909-926.
- 6- Crotty, KL ., May, R., Kulvicki, A., Kumar,D., Neal DE, Jr.,1995. The effect of antimicrobial therapy on testicular aspirate flow cytometry. *J Urol*, 153: 835-838.
- 7- Etchechury, F.M, Gramont, S., Sanchez, R., Romero, C., Enriquez, R., Cervantes, L., Olibarria, R., Millan, G.and Madri, A., 2015. Spirotetramat induces histological and biochemical changes in Wistar rats. – *Rev. Toxicol*, 30: 215-217.
- 8- Falcón-Etchechury, M., Silveira-Gramont, M. I., Robles-Sánchez, R. M., Canett-Romero, R., Ramos-Enríquez, R., López-Cervantes, G., ... & Aldana-Madrid, M. L., 2013. Spirotetramat induce cambios histológicos y bioquímicos en rata Wistar. *Revista de Toxicología*, 30(2); 215-217.
- 9- Farooqi, I. S., & O Rahilly, S., 2004. Monogenic human obesity syndromes. *Recent progress in hormone research*, 59, 409-424.
- 10- Gonzalez, R., Reddy, P., Kaye, K. W., & Narayan, P., 1983. Comparison of Doppler examination and retrograde spermatic venography in the diagnosis of varicocele. *Fertility and Sterility*, 40(1): 96-99.
- 11- Hattori, N., Nomoto, H., Fukumitsu, H., Mishima, S.,Furukawa, Sh.,2007. Royal jellyinduced neurite outgrowth from rat pheo chromo cytoma PC12 cell requires integrin signal independent of activation of extracellular signalregulated kinases. *Biomedical Research*, 28: 139- 146.
- 12- Hesari, Ali Kalantari, et al., 2015.Crocin prevention of anemia-induced changes in structural and functional parameters of mice testes. *Journal of Applied Biomedicine*, 13,3; 213-223.
- 13- Jamnik, P., Goranovič, D., Raspor, D.,2007. Antioxidative action of royal jelly in the yeast cell. *Experimental Gerontology*, 42(7): 594-600.
- 14- Jensen, E. C. Quantitative Analysis of Histological Staining and Fluorescence Using ImageJ. *The Anatomical Record* 2013, 296: 378–381.
- 15- Kaboli Kafshgiri, S., Parivar, K., Baharara, J., Hayati Roodbari, N., & Kerachian, M. A., 2017. Comparison the effect of movento, a chemical pesticide, with chitosan, a biologic pesticide, on female reproductive system in Balb/C mice. *Nova Biologica Reperta*, 3(4), 279-287.
- 16- Koksai, IT., Usta, M., Orhan, I., Abbasoglu, S., Kadioglu, A., 2003.Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian Journal of Andrology*, 5; 95-99.
- 17- Lowry, OH. Rosebrough, NJ. Farr, AL., Randall, RJ.,1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193:265–275.
- 18- Mallinger, A., Nadal, B., Chopin, N., Le Gall, T., 2010. One-Pot synthesis of 3-aryltetramic acids. *European Journal of Organic Chemistry*. 6:1142-1148. DOI: 10.1002/ejoc. 200901092.
- 19- Manas, G. E., Hasanzadeh, S., & Parivar, K., 2013. The effects of pyridaben pesticide on the histomorphometric, hormonal alternations and reproductive functions of BALB/c mice. *Iranian journal of basic medical sciences*, 16(10):1055.
- 20- Mohapatra, S., Deepa, M., & Jagadish, G. K., 2012. An efficient analytical method for analysis of spirotetramat and its metabolite spirotetramatenol by HPLC. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88: 124-128.
- 21- Nauen, R., Bretschneider, T., Elbert, A., Fischer, R., Reckmann, U., & Van Waetermeulen, X., 2006. Biological and mechanistic considerations on the mode of action of spirotetramat. In 11th IUPAC Int. Congress of Pesticide Chemistry (pp. 6-10).
- 22- Niehaus, WG. Samuelsson, JRB.,1968. Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation. *European Journal of Biochemistry*, 6: 126–130.
- 23- Sverdrup, L. C., Bjørge, C., Eklo, O. M., Grung, M., Källqvist, T., Klingen, I., ... & Øvrebø, S., 2013. Risk assessment of the insecticide Movento 100 SC with the active substance spirotetramat. Opinion of the Panel on Plant Protection Products of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety. VKM Report.

The Effect of Spirotetramat Insecticide on the oxidative stress and Histochemical of Testicular Tissue in Balb/c Mice

Ebadimanas Gh.

Dept. of Biology Education, Farhangian University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Today one of the most important challenges for humans is environmental pollution through agricultural toxins, especially insecticides. Spirotetramat is a new insecticide that is widely used by farmers, and its side effects on the reproductive system have not been well studied. The aim of this study was to investigate the effect of spirotetramate on oxidative stress and histochemical changes of testicular tissue in mice. In this study, 24 adult male mice, with a body weight range of 24-32 grams, were obtained from Urmia University Veterinary Animal House and studied. The animals were randomly divided into three groups: controls, test group 1 and test group 2. Each group included 8 mice. Test group 1 and 2 received the spirotetramat at rates of 2.5 and 10 mg/kg body weight, respectively, and the control group received the same amount of distilled water for 45 days orally by gavage. After this period, the mice were anesthetized and microscopic sections were prepared. The level of oxidative stress, carbohydrate reserves, cytoplasmic fat reserves and the level of inflammation in testicular tissue were investigated. Qualitative histochemistry findings were converted into quantitative data using Imag-J software. The results showed that spirotetramat decreased carbohydrate reserves, TAC, TTM and increased fat reserves, alkaline phosphatase enzyme, NO and MDA in the experimental groups compared to the control group. Therefore spirotetramat has increased the oxidative stress and histochemical changes in the testicular tissue by damaging the cells of the spermatogenic tube, as well as by inhibiting the activity of acetyl coenzyme-A.

Key words: Histochemical, oxidative stress, Spirotetramat, Testis, Balb/c Mice