

مقاله پژوهشی

اثر حفاظتی کوئرستین از سیستم تولیدمثل موش‌های سوری نر تحت تاثیر با فیپرونیل

قدرت عبادی مناس

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران

* (نویسنده مسئول مکاتبات): g.ebadi@cfu.ac.ir ; ebadimanas@gmail.com

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۳

چکیده

فیپرونیل یک حشره کش فنیل پیرازول است که برای کشتن طیف وسیعی از حشرات در کشاورزی و دامپزشکی استفاده می شود همانند سایر حشره کش ها عوارض زیادی برای محیط زیست و بخصوص انسان دارد. از طرفی کوئرستین یک ترکیب آنتی اکسیدانی گیاهی است که می تواند سمیت ترکیبات شیمیایی و حشره کش را خنثی کند. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر حفاظتی کوئرستین از سیستم تولیدمثل موش های سوری نر تحت تاثیر با سم فیپرونیل بود. در این مطالعه، تعداد ۳۲ موش سوری نر کوچک آزمایشگاهی کاملاً سالم با وزن تقریبی 25 ± 3 گرم تهیه و به طور تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. گروه فیپرونیل با دوز $4/5 \text{ mg/kg}$ ؛ گروه کوئرستین با دوز 50 mg/kg ؛ گروه کوئرستین به علاوه فیپرونیل؛ فیپرونیل با دوز $4/5 \text{ mg/kg}$ و کوئرستین با دوز 50 mg/kg به طور همزمان و گروه کنترل آب مقطر را به مدت ۲۸ روز بوسیله گاوآذ دریافت کردند. یافته های مطالعه نشان داد گروه فیپرونیل نسبت به کنترل؛ وزن بیضه، ضخامت اپیتلیوم لوله های اسپرم ساز، شاخص جایگزینی مجدد، شاخص اسپرمیوژن، FRAP، TTM، FSH، LH و تستوسترون را کاهش می دهد اما شاخص تمایز لوله ای، قطر لوله های اسپرم ساز، MDA، NO، را نسبت به کنترل افزایش می دهد. تمام پارامترهای بالا در گروه فیپرونیل به علاوه کوئرستین به حالت طبیعی برگردانده می شود. یافته های این مطالعه مشخص کرد که فیپرونیل اثرات منفی روی پارامترهای مورفومتری و فعالیت تولید مثلی در موش های سوری نر دارد و در صورت استفاده هم زمان با کوئرستین، سیستم تولید مثلی موش های سوری را در برابر فیپرونیل حفظ می کند.

کلیدواژه ها: تولیدمثل، فیپرونیل، موش، کوئرستین.

مقدمه

کش ها، فیپرونیل است که برای کشتن طیف وسیعی از حشرات استفاده می شود و همانند سایر ترکیبات شیمیایی و حشره کش ها عوارض زیادی برای محیط زیست و بخصوص انسان دارد که نیاز به مطالعه بیشتری است. از طرفی تحقیقات نشان داده که ترکیبات آنتی اکسیدانی می توانند سمیت ترکیبات شیمیایی و حشره کش را

معمولاً برای کنترل آفات در کشاورزی، خانگی و مراقبت های بهداشتی از حشره کش های متنوعی استفاده می شود و به دلیل مقاوم شدن آفات در برابر آنها هر سال نوع جدیدی از حشره کش ها تولید و وارد بازار می شود. یکی از جدیدترین حشره

خنثی کنند. بنابراین هدف این تحقیق بررسی اثر حفاظتی کوئرستین به عنوان یک ماده آنتی اکسیدانی از سیستم تولیدمثل موش‌های سوری نر تحت تاثیر با سم فیپرونیل بود.

فیپرونیل به گروه فنیل پیرازول تعلق دارد و از طریق مهار نمودن سه نوع کانال عبور کلسیم در غشاء سلول‌های عصبی و ممانعت از نفوذ یون کلسیم به داخل سلول عمل می‌کند، یکی از این کانال‌ها از طریق ناقل الکترون GABA و دو کانال دیگر از طریق گلوتامات اثر می‌کند [۱]. سمیت فیپرونیل برای حشرات بسیار بیشتر از سایر گروه‌های جانوری بخصوص پستانداران است [۲]. علی‌رغم این، فیپرونیل در مهره داران نیز تاثیرگذار است و موجب اختلال تولیدمثلی در موش‌های ماده می‌شود [۳]. تحقیقات نشان داده فیپرونیل در محیط آزمایشگاهی، از طریق افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال و ایجاد استرس اکسیداتیو باعث آپوپتوز در رده‌های مختلف سلولی می‌شود [۴]. همچنین، فیپرونیل باعث افزایش میکرونوکلئوس‌ها، کراسینگ اور و آسیب DNA در لنفوسیت‌های خون انسان می‌شود [۵].

تحقیقات نشان داده استفاده گسترده از این حشره‌کش در محیط‌های کشاورزی و مسکونی باعث بروز بیماری‌های عصبی، ناهنجاری‌های مادرزادی، ناباروری مردان و کاهش رشد جنین می‌شود [۶]. فراتر از سمیت کبدی، استفاده از فیپرونیل با افزایش تولید مولکول‌های رادیکال آزاد، موجب استرس اکسیداتیو و کاهش باروری اسپرم‌ها می‌شود [۷]. تحقیقات پیشین نشان داده استفاده از فیپرونیل میزان آنزیم‌های کبدی، بیومارکرهای عملکرد کلیوی، کلسترول خون، لاکتات دهیدروژناز، مولکول مالون دی‌آلدئید و اکسید نیتریک را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد. با این حال، پروتئین کلی سرم، پروتئین آلبومین و تری‌گلیسیرید، گلوکاتایون، گلوکاتایون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را کاهش می‌دهد و نتیجه این تغییرات، آپوپتوز و از بین رفتن لوله‌های اسپرم‌ساز است [۸].

توهای و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کرده فیپرونیل با افزایش مولکول‌های مالون دی‌آلدئید و فاکتورهای آلفای نکرز تومور و کاهش میزان مولکول گلوکاتایون موجب آسیب سلولی می‌شود [۹]. در مطالعه دیگری آنبر و همکاران (۲۰۲۱) گزارش نموده موش‌های تحت تاثیر با فیپرونیل موجب کاهش قابل توجهی در وزن بدن، قلب، کبد، کلیه همراه با تغییرات شدید تا متوسط

هیستوپاتولوژیک کبدی و کلیوی می‌شود. بنابراین، فیپرونیل یک خطر قوی برای سلامتی حیوانات و انسان‌ها است [۱۰]. ابولغار و همکاران (۲۰۲۰) نشان داده قرار گرفتن در معرض فیپرونیل به مدت ۲۸ روز در دوزهای متوسط و بالا موجب کاهش هماتوکریت، هموگلوبین، پلاکت، تعداد گلبول‌های سفید و قرمز خون می‌شود [۱۱]. میریله مازرو (۲۰۱۸) نشان داد که فیپرونیل در موش‌ها با کاهش گلوکاتایون، ذخایر اسپرمی اپیدیدیم را کاهش، اما با افزایش غلظت مالون دی‌آلدئید فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز را افزایش و فعالیت آنزیم کاتالاز را کاهش می‌دهد [۱۲].

کوئرستین کاروتنوئیدی است که از عصاره گیاه *Crocus sativus L* از خانواده Iridaceous استخراج و تهیه می‌شود. یک ترکیب فلاونول با فعالیت‌های بیولوژیکی مختلف است که در بخش پوست، دانه‌ها، میوه‌ها، گل‌ها و برگ‌های بسیاری از گیاهان وجود دارد [۱۳]. ساختار مولکولی خاص کوئرستین موجب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد می‌شود [۱۴]. دینگ و همکاران (۲۰۲۴) نشان داده کوئرستین به عنوان دارویی ضد میکروبی، کاهش دهنده گلوکز، ضد سرطانی و محافظ قلبی عروقی مورد استفاده قرار می‌گیرد و راحت‌ترین فلاونوئید غذایی است که جذب و در بافت‌ها و مایعات بدن باقی نمی‌ماند. همچنین کوئرستین از آپوپتوز سلول‌های بافت کلیه موش‌های صحرایی تحت تاثیر کادمیوم جلوگیری نموده است [۱۵]. نتایج تحقیقات نشان داده که کوئرستین بافت کبد موش‌های رت نر را در برابر سمیت تیواستامید حفظ می‌کند بطوری که اندازه نودول‌ها میزان آنزیم آلانین‌آمینو ترانسفراز و آنزیم آکالین فسفاتاز را بطور قابل توجهی کاهش می‌دهد [۱۶].

روش کار

فیپرونیل (۵ - آمینو-۱- [۲۶- دی کلرو-۴- (تری فلورومتیل) فنیل]-۴- (تری فلورومتیل سولفنیل)-۱- پیرازول-۳- کربونتریل) با درجه خلوص ۹۶/۶٪، ساخت شرکت Ourofino Agribusiness (Cravinhos) تهیه شد. پودر کوئرستین از شرکت Aldrich sigma تهیه، و تخلیص آن در اتانل ۱ درصد صورت گرفت [۱۷].

حیوانات

در این مطالعه، تعداد ۳۲ موش سوری نر کوچک آزمایشگاهی کاملاً سالم با وزن تقریبی 25 ± 3 گرم از حیوانخانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه و جهت سازگاری شدن موش‌ها با محیط به مدت یک هفته در حیوانخانه نگهداری شدند. در طول مدت آزمایش حیوان‌ها از کنسانتره تغذیه و از شیشه‌های مخصوصی آب می‌نوشیدند. تمام شرایط استاندارد آزمایش (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، درجه حرارت $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ، رطوبت $50 \pm 10\%$) در طی مطالعه کنترل می‌شد. حیوانات به طور تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. گروه فیرونیل با دز $4/5 \text{ mg/kg}$ ؛ گروه کوئرستین با دز 50 mg/kg ؛ گروه کوئرستین با دز $4/5 \text{ mg/kg}$ و کوئرستین با دز 50 mg/kg به طور همزمان و گروه کنترل آب مقطر را به مدت ۲۸ روز بوسیله گاواژ دریافت کردند.

تهیه مقاطع بافتی

در پایان دوره آزمایش موش‌ها توزین و بوسیله زایلازین (20 mg/kg.B) و کتامین (50 mg/kg.BW) بیهوش شدند. سپس موش‌ها بوسیله جابجایی گردنی کشتار و بافت بیضه موش‌ها خارج و در محلول فرمالین قرار گرفت. سپس بطور کامل به داخل پارافین انتقال داده شدند. مراحل پارافین‌گیری از بیضه انجام و برش‌های ۶ میکرومتری از بافت بیضه زده شد. سپس بوسیله آهن - وایگرت رنگ آمیزی شدند و پارامترهای مختلف هیستومورفومتری اندازه گیری شد.

اندازه‌گیری هیستومورفومتری

جهت اندازه‌گیری شاخص جابگزینی مجدد RI (repopulation index)، دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز بوسیله میکروسکوپ بررسی و نسبت سلول‌های اسپرماتوگونی نوع B به اسپرماتوگونی نوع A شمارش و محاسبه شدند. برای محاسبه شاخص تمایز لوله‌های TDI (testicular differential)، درصد لوله‌های اسپرم‌سازی که دارای سه رده سلولی تمایز یافته بودند به عنوان TDI مثبت و درصد لوله‌های که فاقد سه لایه سلولی تمایز یافته بودند به عنوان TDI منفی در نظر گرفته شدند. برای اندازه‌گیری شاخص اسپرم SI (sperm index)، لوله‌های که در لومن خود اسپرم داشتند به

عنوان شاخ اسپرمی مثبت و لوله‌هایی که خالی از اسپرم بودند به عنوان اندکس اسپرمی منفی در نظر گرفته شدند.

ارزیابی شاخص‌های استرس اکسیداتیو

شاخص FRAP

با اندازه‌گیری کاهش قدرت احیاءکنندگی فریک یا FRAP (ferric antioxidant power) می‌توان قدرت آنتی اکسیدانی کل بیضه را مشخص کرد [۱۸]. در این روش با استات بافر PH پایین ایجاد کرده و اثر احیاء شوندگی کمپلکس FeIII-TPTZ به فرم فروس مورد سنجش قرار گرفت. کمپلکس در مجاورت استات بافر رنگ آبی تولید می‌کند. از محلول هموژن بافت بیضه ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به آن ۳ میلی لیتر معرف FRAP اضافه شد. بعد به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. جذب کمپلکس آبی رنگ در ۵۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱۹].

شاخص تیول تام

از روش دیلارد برای اندازه‌گیری مقدار مولکول‌های تیول TTM (Total Thiol Molecules) استفاده شد. در این روش به $0/6$ میلی لیتر بافر EDTA $0/2$ میلی لیتر سرم اضافه شد و در نهایت ۴۰ میکرولیتر DTNB به لوله شیشه‌ای اضافه گردید. با اضافه کردن متانول ظرفیت نهایی به ۵ میلی لیتر رسانده شد. بعد از انکوبه در دمای اتاق، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ (g) 3000 شدند. قدرت جذب مایع رویی در ۴۱۲ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت [۲۰].

شاخص مولکول مالون دی‌آلدئید

برای اندازه‌گیری مقدار مولکول مالون دی‌آلدئید از روش Niehaus و همکاران استفاده شد. میزان مولکول مالون دی‌آلدئید براساس واکنش تیوباریتوریک اسید تعیین می‌شود. در این روش $0/3 - 0/4$ گرم از بافت بیضه که در داخل کلرید پتاسیم سرد شده هموژنیزه شد. سپس ترکیب به مدت ۱۰ دقیقه با دور 3000 سانتیفریوژ شد. نیم میلی لیتر از مایع رویی با ۳ میلی لیتر فسفوریک اسید ۱٪ مخلوط و ۲ میلی لیتر از $6/7$ گرم لیتر تیوباریتوریک به نمونه اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در حرارت 100 درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از خنک شدن ۳

نتایج حاصل به صورت Mean+SE گزارش گردید. از نرم افزار SPSS (ورژن ۱۹) برای تحلیل استفاده شد.

نتایج

مورفومتری

بررسی آماری وزن بیضه نشان داد وزن بیضه موش‌ها در گروه فیپرونیل نسبت به کنترل کاهش یافته اما وزن بیضه گروه QU+F در مقایسه با فیپرونیل افزایش نشان داد که هیچ کدام از این تغییرات معنادار نبود ($p > 0.05$). مشاهده و بررسی مقاطع تهیه شده بوسیله میکروسکوپ نوری نشان داد که قطر لوله‌های اسپرم‌ساز گروه فیپرونیل با گروه کنترل افزایش معناداری ($p < 0.05$) دارد در حالی که گروه QU+F در مقایسه با گروه فیپرونیل کاهش معناداری را در قطر لوله‌ها نشان داد (جدول ۱، شکل ۱). مقایسه ضخامت اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز نشان داد که بین گروه فیپرونیل و کنترل کاهش معناداری وجود دارد ($p < 0.05$) اما بین گروه QU+F و فیپرونیل افزایش معنادار ($p < 0.05$) وجود ندارد.

بررسی آماری مربوط به تمایز لوله‌های اسپرم‌ساز و شاخص اسپرمیوژن مشخص کرد TDI منفی و SI منفی گروه فیپرونیل در مقایسه با کنترل بطور معناداری افزایش نشان داد در حالی که TDI منفی و SI منفی گروه QU+F در مقایسه با فیپرونیل بطور معنادار ($p < 0.05$) کاهش یافته است. بررسی آماری نتایج مربوط به (شاخص جایگزینی مجدد) RI نشان داد که نسبت اسپرماتوگونی نوع B به نوع A گروه فیپرونیل در مقایسه با کنترل کاهش معناداری ($p < 0.05$) دارد اما گروه QU+F نسبت به فیپرونیل افزایش معناداری ($p < 0.05$) دارد (جدول ۱، شکل ۱).

میلی لیتر n- بوتانل اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شدند. مقدار جذب ماده رویی در ۵۳۲ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و مقدار ماده مولکول مالون دی‌آلدئید مشخص و در واحد نانو مول در میلی گرم پروتئین نمونه شد [۲۱].

شاخص NO

برای اندازه‌گیری مقدار نیترات بافتی براساس واکنش گریس انجام گرفت. در این واکنش نیتریک اکسید به نیتريت تبدیل و آن هم به HNO_2 تغییر می‌دهد. محصول حاصل با سولفانامید ترکیب و دیازینوم تولید می‌کند که با LN-(1-naphtyl) enediamine. 2HC ترکیب و نمک دیازینوم حاصل می‌شود. ترکیب نهایی با جذب طول موج ۵۴۰ نانومتر قابل ارزیابی است. مقدار نیترات بافتی برحسب نانومول بر میلی گرم پروتئین در نمونه تعیین می‌گردد [۲۲].

سنجش هورمون‌ها

در پایان آزمایش حیوانات بوسیله زایلازین (20 mg/kg.BW) و کتامین (50 mg/kg.BW) بیهوش و از قلب حیوانات خونگیری انجام شد. برای سنجش هورمون‌های LH, FSH از روش الایزا و برای سنجش هورمون تستوسترون از روش الکتروکمی لومینسانس استفاده شد [۲۳].

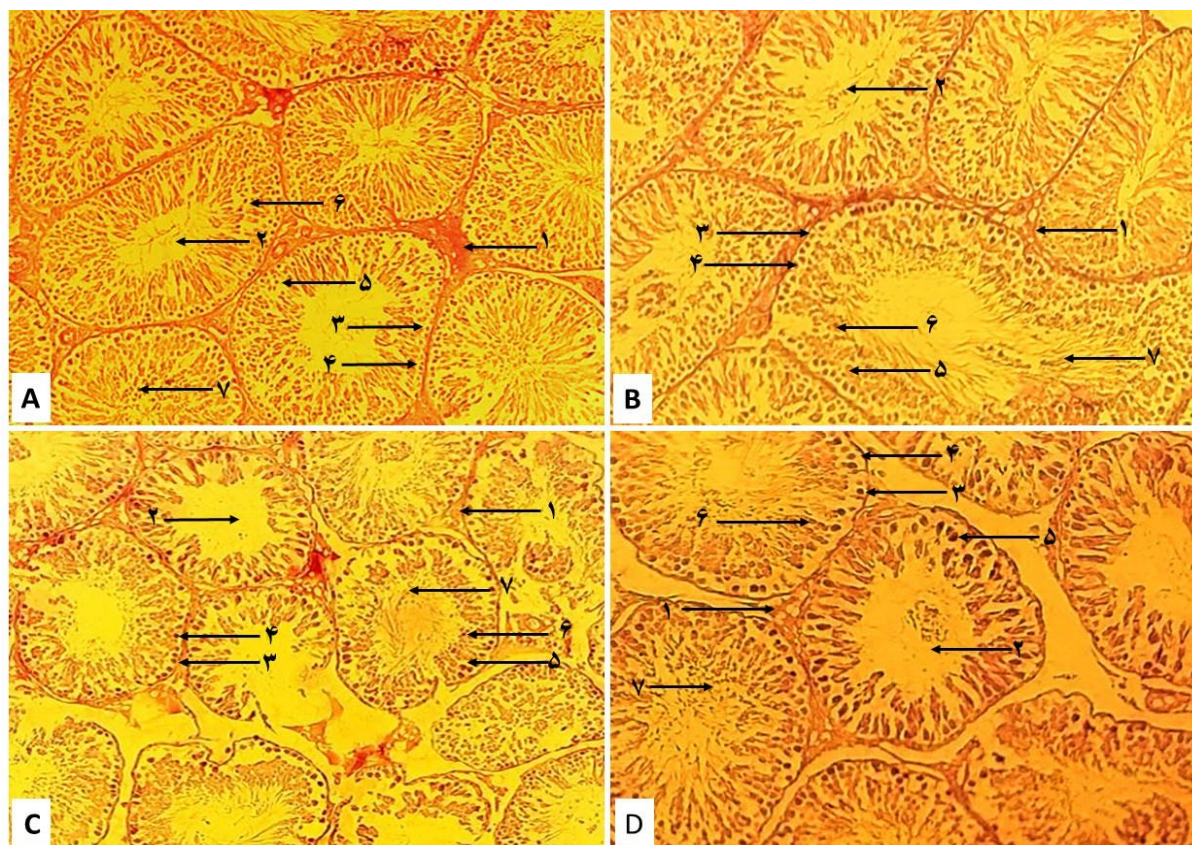
آنالیز آماری

نتایج حاصل از تحقیق با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی برای تعیین گروه‌های دارای اختلاف استفاده شد. سطح اختلاف معنادار بین گروه‌ها $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

جدول ۱: نتایج مورفومتری مربوط به اثربخاطر کونژستین از سیستم تولیدمثل موش سوری تحت تاثیر با فیپرونیل

گروه‌ها	وزن بیضه (میلی گرم)	قطر لوله (میکرومتر)	ضخامت اپی تلیوم لوله (میکرومتر)	شاخص جایگزینی مجدد (%)	شاخص اسپرمیوژن (%)	شاخص تمایز لوله (%)
Control	$70 \pm 2/1$	$169/5 \pm 3/4$	$45/66 \pm 1/41$	$0/86 \pm 4/2$	$9 \pm 0/45$	$0/32 \pm 4/2$
QU	$72 \pm 0/3$	$170/74 \pm 1/65$	$41/81 \pm 1/68$	$0/89 \pm 0/71$	$8/15 \pm 1/19$	$0/2 \pm 1/4$
Fip	$65 \pm 1/2$	$182/32 \pm 1/5^a$	$36/34 \pm 3/8^a$	$0/22 \pm 1/62^a$	$5/1 \pm 2/1^a$	$3/8 \pm 3/1^a$
Fip+QU	$68 \pm 3/5$	$176/55 \pm 1/42^b$	$40/25 \pm 1/7$	$0/73 \pm 0/72^b$	$7/0 \pm 1/9^b$	$0/4 \pm 1/26^b$

a. در مقایسه با گروه کنترل؛ b. در مقایسه با گروه فیپرونیل



شکل ۱: تصاویر بافتی بیضه موش سورئ: A (گروه کنترل)، B (گروه کونرستین)، C (گروه فیرونیل)، D (گروه کونرستین و فیرونیل). ۱- بافت بینابینی ۲- لومن لوله اسپرم ساز ۳- سلول اسپرماتوگونی نوع A ۴- اسپرماتوگونی نوع B ۵- اسپرماتوسیت اولیه ۶- اسپرماتوسیت ثانویه ۷- اسپرماتید ۸- اسپرم

هورمون‌ها

مطالعه داده‌های بدست آمده از آزمایش‌ها آشکار کرد در گروه فیرونیل مقدار هورمون تستوسترون نسبت به کنترل بطور معنادار کاهش یافته است درحالی که مقدار این هورمون در گروه F+QU نسبت به فیرونیل بطور افزایش یافته است این کاهش در هر دو گروه معنا دار نیست. همچنین میزان هورمون FSH, LH نسبت به کنترل بطور معنادار کاهش یافته است درحالی که مقدار این هورمون‌ها در گروه F+QU نسبت به فیرونیل بطور معنادار افزایش یافته است (جدول ۲).

پارامترهای استرس اکسیداتیو TTM, NO, MDA, FRAP

بررسی داده‌های مربوط به استرس اکسیداتیو مشخص کرد که مقدار مولکول‌های TTM, FRAP گروه فیرونیل نسبت به کنترل بطور معناداری کاهش ($p < 0.05$) یافته در حالی که میزان مولکول‌های NO, MDA در مقایسه با کنترل افزایش ($p < 0.05$) نشان داده است. همچنین بررسی نتایج مشخص کرد که گروه F+QU نسبت به فیرونیل مقدار مولکول‌های NO, MDA را بطور معنادار کاهش داده در حالی که مقدار مولکول‌های TTM, FRAP را بطور معناداری افزایش داده است (جدول ۲).

جدول ۲: اثر حفاظتی کونرستین بر روی هیستومورفومتری موش‌های سورئ تحت تاثیر با فیرونیل (Mean $\pm$ SE)

گروه‌ها	Frapp (Mm/l)	MDA (nm/g)	TTM (nm/ml)	NO (nm/mg)	Testosterone (ng/ml)	FSH (IU/L)	LH (IU/L)
Control	۴۳/۲۸ $\pm$ ۱/۵	۰/۲۵ $\pm$ ۰/۱۲	۰/۶۷ $\pm$ ۰/۱۶	۰/۱۳ $\pm$ ۰/۱۴	۴/۵۱ $\pm$ ۰/۱۴	۰/۸۷ $\pm$ ۰/۱۴	۰/۹۵ $\pm$ ۰/۲۲
Qu	۴۱/۷۱ $\pm$ ۲/۳۲	۰/۳۴ $\pm$ ۰/۳۱	۰/۶۱ $\pm$ ۰/۲۶	۰/۱۵ $\pm$ ۰/۱۱	۵/۶۵ $\pm$ ۰/۲۱	۰/۷۹ $\pm$ ۰/۷۴	۰/۹۲ $\pm$ ۰/۷۷
Fip	۲۱/۶۸ $\pm$ ۳/۱۸ ^a	۰/۶۷ $\pm$ ۱/۵۳ ^a	۰/۴۷ $\pm$ ۰/۱۹ ^a	۰/۹۱ $\pm$ ۱/۰۱ ^a	۲/۰۹ $\pm$ ۱/۱	۰/۵۱ $\pm$ ۰/۴۶ ^a	۰/۶۷ $\pm$ ۰/۰۹ ^a
Fip+Qu	۳۷/۴۱ $\pm$ ۱/۶۲ ^b	۰/۴۱ $\pm$ ۰/۳۸ ^b	۰/۵۸ $\pm$ ۱/۳۵ ^b	۰/۵۷ $\pm$ ۰/۲۸ ^b	۳/۶۴ $\pm$ ۱/۲	۰/۶۸ $\pm$ ۰/۲۶ ^b	۰/۸۶ $\pm$ ۰/۸۸ ^b

a. در مقایسه با گروه کنترل؛ b. در مقایسه با گروه فیرونیل

بحث

آنتی اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که می‌توانند میزان سمیت ترکیبات شیمیایی مختلف از جمله حشره‌کش‌ها را کاهش دهند. یکی از ترکیبات آنتی اکسیدانی، کوثرستین است که با خنثی سازی انواع ترکیبات فعال و مضر از جمله گونه‌های فعال اکسیژن سمیت ترکیبات شیمیایی را کاهش می‌دهد. در این مطالعه اثر فیپرونیل بر روی پارامترهای مختلف دستگاه تولیدمثلی موش و میزان حفاظت کوثرستین از دستگاه تولیدمثلی در برابر حشره‌کش فیپرونیل مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج تحقیق نشان داد که فیپرونیل میزان وزن بیضه و ضخامت اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم ساز را نسبت به کنترل کاهش داده است. فیپرونیل به دلیل سمیت خود همزمان با تکنیک سلول‌های ژرمینال و توقف اسپرماتوژنز باعث دژنره شدن اپیتلیوم لوله‌های اسپرم ساز و کاهش ضخامت دیواره و در نتیجه کاهش وزن بیضه شده است. در راستای این نتایج کالپانارامان و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کرد که فیپرونیل در محیط آزمایشگاهی، از طریق افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال، با ایجاد استرس اکسیداتیو باعث آپوپتوز در رده‌های مختلف سلولی می‌شود [۴]. نتایج نشان داد استفاده هم زمان فیپرونیل با کوثرستین، موجب افزایش وزن بیضه و ضخامت اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم ساز نسبت به گروه فیپرونیل شده است. احتمالاً کوثرستین با خاصیت آنتی اکسیدانی خود مولکول‌های فعال ایجاد شده بوسیله فیپرونیل را خنثی و از دژنره شدن دیواره لوله‌ها جلوگیری کرده است. در راستای این نتایج دینگ و همکاران (۲۰۲۴) نشان داد که کوثرستین از آپوپتوز سلول‌های کلیه در برابر کادمیوم جلوگیری می‌کند [۱۵].

نتایج تحقیق نشان داد قطر لوله‌های اسپرم ساز گروه فیپرونیل نسبت به کنترل افزایش یافته است. فیپرونیل احتمالاً به دلیل سمیت خود موجب التهاب بافت بیضه و افزایش قطر لوله شده است. در تأیید این گزارش‌ها، تحقیقات نشان داد که فیپرونیل قادر به القای آسیب‌های ساختاری و عملکردی در بیضه‌ها است و در نتیجه در طی التهاب ناشی از فیپرونیل، نفوذپذیری عروق خونی افزایش می‌یابد و منجر به ادم شدید می‌شود [۲۴]. در حالی که استفاده همزمان فیپرونیل و کوثرستین موجب کاهش قطر

لوله‌های اسپرم ساز شده و دلیل آن خنثی‌سازی سمیت فیپرونیل توسط کوثرستین است.

نتایج تحقیق نشان داد که گروه فیپرونیل پارامترهای TDI منفی و SI منفی را نسبت به کنترل افزایش، اما درصد RI را کاهش داده است. باید توجه کرد موقعی که درصد پارامترهای TDI منفی و SI منفی افزایش می‌یابد نشان دهنده آن است که لایه اپیتلیومی تحت دژنره قرار گرفته و نازکتر می‌شود. کاهش درصد RI نشان دهنده آن است که نسبت اسپرماتوگونی نوع B به نوع A با فیپرونیل کاهش یافته است. اما استفاده همزمان فیپرونیل با کوثرستین باعث بهبود این پارامترها شده است. مطابق نتایج این تحقیق خو و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کرده که کوثرستین به دلیل داشتن ساختار مولکولی خاص، موجب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد شده و از دژنره شدن سلول‌ها جلوگیری می‌کند [۲۵].

نتایج تحقیق نشان داد گروه فیپرونیل نسبت به کنترل مقدار MDA و NO افزایش اما مقدار TTM و FRAP را کاهش داده است. دلیل احتمالی آن کاهش آنزیم‌های آنتی اکسیدانی طی تولید گونه‌های فعال اکسیژن توسط فیپرونیل است. درحالی که استفاده همزمان فیپرونیل و کوثرستین موجب کاهش مقدار MDI و NO و افزایش مقدار TTM و FRAP شده است. چون کوثرستین با خاصیت آنتی اکسیدانی خود از تولید گونه‌های فعال اکسیژن جلوگیری کرده و مانع استرس اکسیداتیو در موش‌ها شده است. چی و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کرد که کوثرستین موجب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد می‌شود [۲۶]. با توجه به حفاظت لوله‌های اسپرم ساز توسط کوثرستین و افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی در موش‌های تحت تاثیر با فیپرونیل، هورمون‌های جنسی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت نتایج نشان داد که در گروه فیپرونیل میزان هورمون‌های تستوسترون، FSH و LH در مقایسه با کنترل کاهش یافته است که دلیل آن افزایش سطح مولکول‌های استرس اکسیداتیو و کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی بوسیله فیپرونیل و اثر منفی آنها بر روی هیپوتالاموس و کاهش هورمون‌های آزاد کننده گنادوتروپین است. استفاده همزمان فیپرونیل و کوثرستین موجب افزایش هورمون‌های تستوسترون، FSH و LH شده است. این نتایج در

- [9] Tohamy HG, El-Kazaz SE, Alotaibi SS, Ibrahim HS, Shukry M, Dawood MA. Ameliorative effects of boswellic acid on fipronil-induced toxicity: antioxidant state, apoptotic markers, and testicular steroidogenic expression in male rats. *Animals*. 2021 Apr 30; 11(5): 1302.
- [10] HA A, Abdo W, Abd El-Raof, TK., Abdallah, SA., Mousa, A. Assessment of hepato-renal toxicity of fipronil pesticide in male albino mice. *Egy. J. Plant Pro. Res.* 2021, 9 (1): 39 – 53.
- [11] Abouelghar GE, El-Bermawy ZA, Salman HM. Oxidative stress, hematological and biochemical alterations induced by sub-acute exposure to fipronil (COACH®) in albino mice and ameliorative effect of selenium plus vitamin E. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020 Mar; 27: 7886-900.
- [12] Mazzo M, Balieira KV, Bizerra PF, Mingatto FE. Fipronil-induced decrease in the epididymal sperm count: oxidative effect and protection by vitamin E. *Animal Reproduction*. 2018 Oct; 15(4): 1223 .
- [13] Bhatt K, Flora SJ. Oral co-administration of α -lipoic acid, quercetin and captopril prevents gallium arsenide toxicity in rats. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2009 Jul 1; 28(1): 140-6.
- [14] Qi W, Qi W, Xiong D, Long M. Quercetin: its antioxidant mechanism, antibacterial properties and potential application in prevention and control of toxipathy. *Molecules*. 2022 Oct 3; 27(19): 6545.
- [15] Ding L, Wang K, Zhu H, Liu Z, Wang J. Protective effect of quercetin on cadmium-induced kidney apoptosis in rats based on PERK signaling pathway. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2024 Mar 1; 82: 127355.
- [16] El-Alkamy AM, Tayel SM, Safwat M, Abdallah DM, Nabil NM. The Protective Effect of Quercetin on Thioacetamide-Induced Liver Cirrhosis in Adult Male Albino Rats. *Egyptian Journal of Histology*. 2023 Jun 1; 46(2): 561-74.
- [17] Omran OM, Omer OH. The effects of alpha-lipoic acid on breast of female albino rats exposed to malathion: Histopathological and immunohistochemical study. *Pathology-Research and Practice*. 2015 Jun 1; 211(6): 462-9.
- [18] Crotty KL, May R, Kulvicki A, Kumar D, Neal DE. Investigative Urology: The Effect of Antimicrobial Therapy on Testicular Aspirate Flow Cytometry. *The Journal of urology*. 1995 Mar; 153(3): 835-8.
- [19] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol

راستای نتایج ندوفیا-کوماسی و همکاران در سال ۲۰۲۲ در باره نقش حفاظتی کوئرستین در برابر حشره کش آترازین است [۲۷].

نتیجه گیری

یافته های این مطالعه مشخص کرد که فیپرونیل اثرات منفی روی پارامترهای مورفومتری و فعالیت تولیدمثلی در موش های سوری دارد و در صورت استفاده هم زمان با کوئرستین، سیستم تولید مثلی موش سوری را در برابر فیپرونیل حفظ می کند.

منابع

- [1] Khalaf AA, Galal MK, Ibrahim MA, Allah AA, Afify MM, Refaat R. The Terminalia laxiflora modulates the neurotoxicity induced by fipronil in male albino rats. *Bioscience Reports*. 2019 Mar; 39(3): BSR20181363.
- [2] Hainzl D, Cole LM, Casida JE. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chemical research in toxicology*. 1998 Dec 21;11(12):1529-35.
- [3] Ohi, M., Dalsenter, P.R., Andrade, A.J.M. and Nascimento, A.J., 2004. Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. *Toxicology letters*, 146(2), pp.121-127.
- [4] Kalyanaraman B, Hardy M, Zielonka J. A critical review of methodologies to detect reactive oxygen and nitrogen species stimulated by NADPH oxidase enzymes: implications in pesticide toxicity. *Current pharmacology reports*. 2016 Aug; 2: 193-201.
- [5] Khan S, Jan MH, Kumar D, Telang AG. Fipronil induced spermatotoxicity is associated with oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male rats. *Pesticide biochemistry and physiology*. 2015 Oct 1; 124: 8-14.
- [6] Eisa AA, Abo-Elghar GE, Ammar IM, Metwally HG, Arafa SS. Embryotoxicity and teratogenicity of fipronil in rats (*Rattus norvegicus*). *Zagazig Journal of Agricultural Research*. 2017 Sep 1; 44(5): 1851-61.
- [7] Agarwal A, Sengupta P. Oxidative stress and its association with male infertility. *Male infertility: contemporary clinical approaches, andrology, ART and antioxidants*. 2020: 57-68.
- [8] AlBasher G, Abdel-Daim MM, Almeer R, Ibrahim KA, Hamza RZ, Bungau S, Aleya L. Synergistic antioxidant effects of resveratrol and curcumin against fipronil-triggered oxidative damage in male albino rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020 Feb; 27: 6505-14.

- reagent. J biol Chem. 1951 Nov 1; 193(1): 265-75.
- [20] Jamnik P, Goranovič D, Raspor P. Antioxidative action of royal jelly in the yeast cell. *Experimental gerontology*. 2007 Jul 1; 42(7): 594-600.
- [21] Niehaus Jr WG, Samuelsson B. Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation. *European journal of biochemistry*. 1968 Oct; 6(1): 126-30.
- [22] Hattori N, Nomoto H, Fukumitsu H, Mishima S, Furukawa S. Royal jelly-induced neurite outgrowth from rat pheochromocytoma PC12 cells requires integrin signal independent of activation of extracellular signalregulated kinases. *Biomedical Research*. 2007; 28(3): 139-46.
- [23] Zahmatkesh E, Najafi G, Nejati V, Heidari R. Protective effect of royal jelly on the sperm parameters and testosterone level and lipid peroxidation in adult mice treated with oxymetholone. *Avicenna journal of phytomedicine*. 2014 Jan; 4(1): 43.
- [24] Senthilkumar T. Studies on the pathological effects of fipronil and their amelioration by curcumin in rats (Doctoral dissertation, Centre of Excellence in Pathology, College of Veterinary and Animal Sciences, Mannuthy).
- [25] Xu D, Hu MJ, Wang YQ, Cui YL. Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules*. 2019 Mar 21; 24(6): 1123 .
- [26] Qi W, Qi W, Xiong D, Long M. Quercetin: its antioxidant mechanism, antibacterial properties and potential application in prevention and control of toxipathy. *Molecules*. 2022 Oct 3; 27(19): 6545 .
- [27] Ndufeiya Kumasi LC, Abarikwu SO, Ohanador R, Omoregie ES. Curcumin improves the protective effects of quercetin against atrazine-induced testicular injury in adult Wistar rats. *Andrologia*. 2022 Aug; 54(7): e14445.

The Protective Effect of Quercetin on the Reproductive System of Balb/c Mice Exposed to Fipronil

Ebadi Manas G.

Department of Biology Education, Farhangian University, Tehran, Iran

* (Corresponding author): ebadimanas@gmail.com ; g.ebadi@cfu.ac.ir

Received: December 2024

Accepted: March 2025

Abstract

Fipronil, a widely used phenylpyrazole insecticide in agriculture and veterinary medicine, poses environmental and human health risks. Quercetin, a plant-derived antioxidant, has shown potential in neutralizing the toxicity of various chemicals, including insecticides. This study aimed to evaluate the protective effects of quercetin on the reproductive system of mice exposed to fipronil. Thirty-two healthy male Balb/c mice (25 ± 3 grams) were randomly divided into four groups of eight: the Fipronil group (4.5 mg/kg fipronil), Quercetin group (50 mg/kg quercetin), Fipronil + Quercetin group (4.5 mg/kg fipronil + 50 mg/kg quercetin), and a Control group (distilled water). All treatments were administered via gavage for 28 days. The fipronil group showed significant reductions in testis weight, seminiferous tubule epithelial thickness, spermiogenesis index, FRAP, TTM, FSH, LH, and testosterone levels compared to the control group. Conversely, the tubular differentiation index, tubule diameter, sperm count, MDA, and NO levels increased in the fipronil-treated group. Co-administration of quercetin with fipronil restored these parameters to near-normal levels. Fipronil negatively affects morphometric parameters and reproductive function in male mice. However, quercetin co-administration provides protective effects, reducing the reproductive toxicity induced by fipronil.

Keywords: Reproduction; Fipronil; Mice; Quercetin.