Protective effects of curcumin against gamma-radiation on Rats

Z. Hamzavi Jahromi [1] S. Zolghadri Jahromi [2] V. Hemayatkhah Jahromi [2] H. Kargar Jahromi [3] S. Erfanian [4]

MSc of Zoology [1] , Assistant Professor Department of Boiology [2] , MSc of Biology [3] , Young Research and Elite club , Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran. MSc of Biochemistry [4] , Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran.

(Received 12 Apr, 2013 Accepted 19 Aug, 2013)

Original Article

Abstract

Introduction: Radiation therapy is a stage of therapeutic in the management of tumors that causes normal cells damage. So, Radioprotective drugs are injected before radiotherapy to reduce cell damages and death against ionizing radiation. Curcumin is an antioxidant compound. The aim of this study is to investigate the possible protective effect of curcumin against Gamma-Radiation in male rats.

Methods: 70 adult male wistar rats randomly divided into 10 groups including: control, sham, Experimental 1 (treatment with maximum of curcumin in amount of 100 mg/ml), Experimental 2 (treatment with medium of curcumin in amount of 50 mg/ml), Experimental 3 (treatment with minimum of curcumin in amount of 25 mg/ml), Experimental 4 (treatment with curcumin in amount of maximum+radiation), Experimental 5 (treatment with curcumin in amount of medium+radiation), Experimental 6 (treatment with curcumin in amount of minimum+radiation), Experimental 7 (solvent+radiation), Experimental 8 (exposure to irradiation). All animals recived intraperitoneal injection. The testes were fixed and section stained with Haematoxyline & Eosin for 15 days. Using a microscope equipped with a scaled ocular micrometer and image analysis software, histomorphometry was performed.

Results: Gamma-radiation with dose of 2 Gy caused severe degeneration changes in testicular tissue including significant decrease of epithelium thickness and the number of spermtogonia, spermatid and spermatozoa and significantly increased the proportion of lumen diameter to seminiferous tubule diameter and primary spermatocyte compare with control group ($P<0.05$). So, treatment with curcumin balances adverse effects of Gamma-radiation on testis structure and leads spermatogenesis to normal state.

Conclusion: These results suggest that curcumin have antioxidant properties and protects testis structure against Gamma-radiation.

Correspondence:
S. Zolghadr Jahromi, PhD.
Department of Biology,
Islamic Azad University,
Jahrom Branch.
Jahrom, Iran
Tel:+98 791 4447002
Email:
szhahromi@yahoo.com

Key words: Curcumin – Gamma, Radiation – Testis - Rats

Citation: Hamzavi Jahromi Z, Zolghadri Jahromi S, Helayatkhsh Jahromi V, Kargar Jahromi H, Erfanian S. Protective effects of curcumin against gamma-radiation on Rats. Hormozgan Medical Journal 2014;18(2):120-130.

اثر حفاظتی کورکومین علیه پرتو گاما در بیضه موش صحرایی

زهرا حمزوی جهرمی [۱] سمانه ذوالقدری جهرمی [۲] وحید حمایت‌خواه جهرمی [۲] حسین کارگر جهرمی [۳] سعیده عرفانیان [۴]
[۱] کارشناس ارشد، جانورشناسی، [۲] استادیار، گروه زیست‌شناسی، [۳] کارشناس ارشد، جانورشناسی باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران.
[۴] کارشناس ارشد، بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران.

مجله پزشکی هرمزگان سال هجدهم شماره دوم ۹۳ صفحات ۱۳۰-۱۲۰

چکیده

مقدمه: *پرتودرمانی یکی از مراحل درمانی سرطان است که سبب آسیب سلول‌های سالم بدن نیز می‌گردد. بدین منظور ترکیباتی با نام داروهای محافظ پرتوی، قبل از تابش اشعه تجویز شده تا آسیب و مرگ ناشی از پرتوهای یونیزان را کاهش دهند. کورکومین به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی شناخته شده است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر محافظتی کورکومین بر اختلالات اسپرماتوژنز ناشی از پرتودهی گاما با کمک ارزیابی‌های بافت شناسی بر بافت بیضه می‌باشد.*

روش کار: *تعداد ۷۰ راس موش صحرایی بالغ نر نژاد ویستار با سن تقریبی ۱۴-۱۲ هفته و وزن تقریبی ۲۰۰-۱۷۰گرم به ۱۰ گروه شامل: کنترل (بدون هرگونه عملیات)، شاهد (دریافت روغن زیتون با حجم ۱ml/kg)، تجربی ۱ (دریافت حداکثر کورکومین با دوز ۱۰۰mg/kg در ۱ ml روغن زیتون)، تجربی ۲ (دریافت متوسط کورکومین با دوز ۵۰mg/kg در ۱ ml روغن زیتون)، تجربی ۳ (دریافت حداقل کورکومین با دوز ۲۵ mg/kg در ۱ ml روغن زیتون)، تجربی ۴ (دریافت حداکثر کورکومین (۱۰۰mg/kg) + اشعه با شدت ۲ گری)، تجربی ۵ (دریافت متوسط کورکومین (۵۰mg/kg) + اشعه با شدت ۲ گری)، تجربی ۶ (دریافت حداقل کورکومین (۲۵mg/kg) + اشعه با شدت ۲ گری)، تجربی ۷ (دریافت حلال (با حجم ۱ ml + اشعه با شدت۲ گری)، تجربی ۸ (دریافت اشعه با شدت ۲ گری) تقسیم شدند. همه حیوانات داروها را به مدت ۱۵ روز و به روش درون صفاقی دریافت کردند. پس از نمونه‌گیری، ثابت سازی و آماده سازی، از نمونه‌های بیضه مقاطع عرضی ۵ میکرونی تهیه گردید. سپس مقاطع با روش H&E رنگ‌آمیزی شده و با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل Nikon مجهز به نرم‌افزار Dinocapture (کامپیوتری آنالیز تصاویر)، هیستومورفومتری شدند. آنالیز آماری بر اساس نرم‌افزار SPSS 15 تجزیه و تحلیل و داده ها توسط آنالیز واریانس دو طرفه صورت گرفته است.*

نتایج: *نتایج نشان دادند که پرتودهی گاما با دوز ۲ Gy باعث تغییرات تخریبی شدید بافت بیضه شامل کاهش ضخامت اپی‌تلیوم زایا و افزایش معنی‌دار (P≤۰/۰۵) قطر مجرای لومن نسبت به قطر لوله منی ساز و آسیب سلولی در روند اسپرماتوژنز از جمله: سبب افزایش معنی دار (P≤۰/۰۵) در تعداد سلولهای اسپرماتوسیت اولیه، کاهش معنی دار در تعداد سلولهای اسپرماتوگونی، اسپرماتید، اسپرماتوزوئید در مقایسه با گروه کنترل گردید. از طرفی تیمار با کورکومین باعث کاهش و تعدیل این تغییرات شده و ساختار بیضه و روند اسپرماتوژنز وضعیتی نزدیک به حالت طبیعی را نشان دادند.*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد کورکومین می‌تواند به عنوان محافظ پرتوی مؤثر بر بافت بیضه محسوب گردد.*

کلیدواژه‌ها: *کورکومین – پرتو گاما – بیضه – موش‌های صحرایی*

نویسنده مسئول:
دکتر سمانه ذوالقدری جهرمی
گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم
جهرم – ایران
تلفن: ۰۷۹۱ ۴۴۴۷۰۰۲ ۹۸+
پست الکترونیکی:
szjahromi@yahoo.com

نوع مقاله: پژوهشی
دریافت مقاله: ۹۲/۱/۲۳ اصلاح نهایی: ۹۲/۴/۲۵ پذیرش مقاله: ۹۲/۵/۲۳
ارجاع: حمزوی جهرمی زهرا، ذوالقدری جهرمی سمانه، حمایت خواه جهرمی وحید، کارگر جهرمی حسین، عرفانیان سعیده. اثر حفاظتی کورکومین علیه پرتو گاما در بیضه موش صحرایی. مجله پزشکی هرمزگان ۱۳۹۳؛۱۸(۲):۱۳۰-۱۲۰.

مقدمه:

یکی از مراحل درمانی سرطان، پرتودرمانی است. در این روش با تابش انرژی بالای پرتوهای یونیزان مانند اشعه X و گاما به سلول سرطانی و آسیب به DNA آنها، سبب مرگ سلول سرطانی می‌گردند (۱). علاوه بر استفاده بالینی از پرتوها، انسان هر روز در معرض برخورد با میدان‌ها و تشعشعات الکترومغناطیس و گاهی تشعشعات گاما قرار می‌گیرد (۲). پرتو گاما از نوع پرتو یونیزان غیرمستقیم می‌باشد. این پرتوها خود آسیب شیمیایی و بیولوژیکی ایجاد نمی‌کنند بلکه هنگام گذر از ماده جاذب با واگذاری انرژی، ذرات باردار سریع تولید می‌کنند (۳). پرتودهی یونیزان اتم‌ها و مولکول‌های یونیزه شده و برانگیخته را ایجاد می‌کنند. این برانگیختگی می‌تواند: ۱-

رادیکال‌های آزاد ایجاد کند. ۲- باندهای شیمیایی را بشکند. ۳- باندهای شیمیایی جدیدی را تولید کند و اتصال بین ماکرومولکول‌ها را بشکند. ۴- به مولکول‌های تنظیمی فرآیندهای سلول زنده آسیب برساند (۴). در اثر غیرمستقیم، پرتو یونیزان در طی برهمکنش با سیستم‌های زیستی با تولید رادیکال‌های آزاد در مولکول‌های زیستی از طریق رادیولیز آب موجود در سلول‌ها به مولکول‌های زیستی ضربه می‌زنند و در طی واکنش با مولکول‌های آب محدوده گسترده‌ای از گونه‌های اکسیژنی (ROS) فعال مانند e_{aq}، OH°، H°، OH^{-}، H، O_2 و پراکسیدها تولید می‌نمایند (۵).

گونه‌های اکسیژنی فعال Reactive Oxygen Sysetm(ROS) دارای میل ترکیبی بالایی است بنابراین با همه اجزای سلولی واکنش نشان داده که در این میان، DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها اهداف اصلی برای حمله رادیکال‌های OH می‌باشند. به طوری که در نتیجه برهمکنش رادیکال‌های OH با ژنوم سلولی، در طی آبشاری از وقایع، سبب انواع اختلالات فیزیولوژیکی و در نهایت مرگ سلولی می‌شوند (۵). از آنجایی که فرآیند اسپرماتوژنز یک فعالیت بسیار فعال است که تخمین می‌زنند در هر ثانیه ۱۰۰۰ اسپرم تولید می‌کند. میزان بالایی از تقسیم سلول در این فرآیند دلالت بر میزان بالای مصرف اکسیژن میتوکندریایی بوسیله اپی‌تلیوم ژرمینال دارد. هرچند که، رگزایی ضعیف بیضه‌ها به معنای این است که فشار اکسیژن در این بافت پایین است (۶). با اینکه فشار اکسیژن ریز محیط بیضه‌ای را تعیین می‌کند، این بافت به استرس اکسیداتیو ناشی از وفور اسیدهای چرب غیراشباع و حضور گونه‌های اکسیژنی فعال (ROS) آسیب‌پذیر می‌ماند (۷). گروهی از ترکیبات طبیعی یا مصنوعی که تجویز آن قبل از پرتودهی آسیب و مرگ ناشی از پرتوهای یونیزان را کاهش می‌دهند. محافظت کننده‌های پرتوی می‌نامند (۲). این ترکیبات می‌توانند قبل از پرتوگیری در بیماران تحت پرتو درمانی، کارکنان مشاغل مرتبط با پرتو و افراد جامعه در مواقع حوادث ناشی از پرتو کاربرد داشته باشند (۸). این داروها بر حساسیت سلول‌ها نسبت به اشعه، اثر نمی‌گذارند، بلکه از کل حیوان محافظت به عمل می‌آورند (۹). از دهه ۱۹۷۰ به بعد تحقیقات زیادی برای یافتن مواد و محافظت کننده‌هایی که بتواند از بافت‌های طبیعی محافظت بنماید بدون اینکه اثر مشابهی بر سلول‌های تومور داشته باشد، آغاز گردید و از آن زمان تاکنون مواد شیمیایی مختلفی معرفی شدند (۱۰). کورکومین یکی از آنهاست. این ماده پیگمان زردرنگ در ریزوم زردچوبه و به عنوان کورکومینوئید اصلی به شمار می‌آید. کورکومینوئیدها فنل طبیعی محسوب می‌شوند. کورکومومین به خاطر فعالیت‌های محافظ پرتوی و حساسیت پرتوی‌اش شهرت یافته است، که هر یک دارای مکانیسم‌های متفاوتی‌اند. این ماده دارای یک عملکرد دوجانبه در طی پرتودهی وابسته به دوز می‌باشد. بدین معنا که می‌تواند آسیب ناشی از پرتودهی در دوز پائین را حفاظت کند (خاصیت محافظت پرتوی کورکومین)، از طرفی باعث افزایش اثر پرتودهی در دوز بالاتر می‌گردد (خاصیت حساسیت پرتوی کورکومین) (۱۱). کورکومین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی، مکانیسم محافظتی خود رادر برابر رادیکال‌های آزاد ناشی از پرتودهی را با افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اعمال می‌نماید (۱۵-۱۲). همچنین کورکومین از فعالیت فاکتورهای رونویسی که در سرطان‌زایی دخالت دارد، ممانعت می‌کند (۱۶).

از آنجایی که امروزه تعداد زیادی از افراد مبتلا به سرطان و کارکنان مشاغل مرتبط با پرتوها، جوان و در سنین باروری هستند و مضرات احتمالی اشعه گاما در رادیوتراپی‌ها و محیط‌های دیگر، عملکرد تولید مثلی و باروری آنها را دچار اختلال کرده و در نهایت منجر به عقیمی در این افراد می‌گردد، لذا بر آن شدیم تا تأثیر تشعشعات گاما با شدت ۲ گری را بر بافت بیضه که بافت پرخونی است، به عنوان میزان شدتی که بر فرآیند اسپرماتوزنز مورد بررسی قرار نگرفته است، مورد بررسی قرار داده و نقش کورکومین را به عنوان یک محافظت‌کننده مورد مطالعه قرار دهیم.

روش کار:

در این مطالعه تجربی از ۷۰ موش صحرایی نر بالغ نژاد Wistar با سن تقریبی ۱۴-۱۲ هفته و وزن تقریبی ۲۰۰-۱۱۷۰ گرم استفاده گردید. حیوانات از مرکز پرورش حیوانات دانشکده پزشکی شیراز تهیه گردیدند و پس از انتقال به خانه حیوانات دانشگاه آزاد واحد جهرم، جهت تطابق با محیط، ۲۴ ساعت در قفس‌های خود بدون تزریق و با مصرف آب و غذا و شرایط استاندارد بسر بردند. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد در قفسی متحرک از جنس ماکرولون نگهداری شدند. آب آشامیدنی حیوانات از آب لوله‌کشی و تغذیه آنها از غذاهای فشرده تهیه شده از شرکت سهامی خوراک دام و طیور استفاده می‌شد. قبل از تزریق دارو (کورکومین)، به روش LD50 با در نظر گرفتن ۱۵ راس موش صحرایی بالغ به سه گروه ۵ تایی دز کشنده

(LD) ۲۰۰ تعیین گردید. در بررسی حاضر موش صحرایی به ۱۰ گروه مساوی (۷ تایی) به صورت تصادفی به شرح زیر تقسیم شدند:

۱- گروه کنترل: هیچ عملیاتی روی آنها انجام نگرفت و همراه با گروه‌های آزمایشی برای کنترل استرس ناشی از مراحل مختلف آزمایش و شرایط محیطی نگهداری شدند.

۲- گروه حلال (شم): ml ۱ روغن زیتون به صورت درون صفاقی به مدت ۱۵ روز دریافت کردند.

۳- گروه کورکومین حداکثر (تجربی۱): ۱۰۰mg/kg کورکومین حل شده در ml ۱ روغن زیتون را روزانه یک بار به صورت درون صفاقی به مدت ۱۵ روز دریافت کردند.

۴- گروه کورکومین متوسط (تجربی۲): ۵۰mg/kg کورکومین حل شده در ml ۱ روغن زیتون را روزانه یک بار به صورت درون صفاقی به مدت ۱۵ روز دریافت کردند.

۵- گروه کورکومین حداقل (تجربی۳): ۲۵mg/kg کورکومین حل شده در ml ۱روغن زیتون را روزانه یک بار به صورت درون صفاقی به مدت ۱۵ روز دریافت کردند.

۶- گروه حداکثر کورکومین + اشعه (تجربی۴): ۱۰۰mg/kg کورکومین حل شده در ml۱روغن زیتون را روزانه یک بار به صورت درون صفاقی به مدت ۱۵ روز دریافت کردند سپس روز بعد با پرتو گاما به شدت ۲ گری پرتودهی شدند.

۷- گروه کورکومین متوسط + اشعه (تجربی۶) :۵۰ mg/kg کورکومین حل شده در ml۱ روغن زیتون را روزانه یک بار به صورت درون صفاقی به مدت ۱۵ روز دریافت کردند سپس روز بعد با پرتو گاما به شدت ۲ گری پرتودهی شدند.

۸- گروه کورکومین حداقل + اشعه (تجربی۷): ۲۵mg/kg کورکومین حل شده در ml ۱روغن زیتون را روزانه یک بار به صورت درون صفاقی به مدت ۱۵ روز دریافت کردند، سپس روز بعد با پرتو گاما به شدت ۲ گری پرتودهی شدند.

۹- گروه حلال + اشعه (تجربی۸): ml۱ روغن زیتون به صورت درون صفاقی به مدت ۱۵ روز دریافت کردند و سپس روز بعد با پرتو گاما به شدت ۲ گری پرتودهی شدند.

۱۰- گروه اشعه (تجربی۹): مشابه سایر گروهها تغذیه و نگهداری شدند و سپس بعد از ۱۵ روز با پرتو گاما با شدت ۲ گری پرتودهی شدند.

در این بررسی جهت پرتودهی از چشمه سزیم -۱۳۷ با انرژی ۶۶۲ کیلوالکترون ولت استفاده شده که پرتو گاما می‌تاباند.

این مطالعه، در مرکز تحقیقات تابش دانشگاه شیراز صورت گرفت. پرتودهی موش‌ها در فاصله معین از چشمه با احتساب یکنواخت بودن میدان و محاسبه زمان، به میزان ۲ گری انجام گردید. از آنجایی که کورکومین در دوز پایین اشعه خاصیت محافظتی خود را نشان می‌دهد. بنابراین شدت تابش در این حد انتخاب گردید. یک روز پس از پرتودهی، در طی بیهوشی حیوانات توسط دی‌اتیل اتر، نمونه بیضه آنها خارج و بلافاصله پس از توزین، عمل ثابت سازی نمونه‌ها با محلول فرمالین به مدت ۳ روز انجام شد. پس از انجام عملیات آماده‌سازی و قالب‌گیری و رنگ‌آمیزی با روش‌های H&E، مقاطع بافتی به صورت مقاطع پشت سرهم (Serial section) به فاصله ۴۰ میکرومتر و به ضخامت ۵ میکرومتر جهت مطالعات بافت‌شناسی تهیه شد.

جهت شمارش سلولها در میدان دید از هر لام، سه برش به طور تصادفی انتخاب و در هر برش، ۴ مقطع کاملاً عرضی از لوله‌های اسپرم‌ساز در مرحله پنج اسپرماتوژنز انتخاب گردید و با بزرگنمایی‌های۱۰۰× و ۴۰ × سلولهای موجود در لوله‌های سمینی فروس را مورد مطالعه و شمارش قرار دادیم. جهت اندازه‌گیری قطر لوله، مجرای مرکزی و ضخامت اپی‌تلیوم منی‌ساز، ۲۰ لوله گرد به طور تصادفی انتخاب و سپس با استفاده از نرم‌افزار Dino captur و میکروسکوپ دوربین‌دار مدل Nikon اندازه‌گیری شد و فتومیکروگراف‌های مربوطه تهیه گردید. آنالیز آماری بر اساس نرم‌افزار SPSS 15 و آنالیز داده‌ها توسط واریانس یک طرفه، آزمون‌های آنالیز، تست Duncan و ANOVA دو طرفه استفاده شده است و اختلاف معنی‌دار تا سطح $P\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شده و نتایج بدست آمده به همراه محاسبات آماری مربوطه به صورت میانگین±خطای انحراف معیار ($\bar{x} \pm SEM$) بیان و به صورت جدول آورده شده است

نتایج:

یافته‌های هیستومورفومتری. میانگین وزن بیضه در همه گروههای تجربی نسبت به گروه کنترل و شم اختلاف معنی‌داری نشان ندادند (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱- مقایسه مقادیر میانگین±انحراف معیار وزن بیضه، تعداد اسپرماتوگونی، اسپرماتویست اولیه، اسپرماتید بین گروههای مختلف مورد مطالعه

گروهها	متغیرها	وزن بیضه‌ها (gr)	تعداد اسپرماتوگونی	تعداد اسپرماتویست اولیه	تعداد اسپرماتید
کنترل n=۷		۱/۳۳۸±۰/۰۷۱ a	۶۹/۲۱۶±۱/۲۳۶ b	۵۹/۶۶۶±۳/۲۸۲ a	۱۵۲/۰۰±۷/۲۳۴ b
شم n=۷		۱/۳۴۹±۰/۰۳۰ a	۶۷/۸۰±۱/۰۶۷ b	۶۲/۱۹۸±۱/۱۰۲ a	۱۴۸/۸۰±۹/۰۵۷ b
تجربی ۱	n=۷	۱/۳۳۹±۰/۰۰۵ a	۶۹/۲۴۷±۳/۳۳۸ b	۶۲/۷۰۷±۱/۰۹۳ a	۱۷۲/۵۰±۱۱/۹۰۵ b
تجربی ۲	n=۷	۱/۳۲۹±۰/۰۰۸ a	۶۸/۵۸۰±۳/۵۵۶ b	۶۲/۵۸۲±۱/۹۳۰ a	۱۶۴/۲۵۰±۱۴/۷۶۶ b
تجربی ۳	n=۷	۱/۳۲۷±۰/۰۷۶ a	۶۷/۲۴۷±۲/۵۵۳ b	۶۱/۹۹۷±۱/۵۹۹ a	۱۵۷/۲۵۰±۱۳/۲۱۸ b
تجربی ۴	n=۷	۱/۳۱۱±۰/۰۳۳ a	۶۶/۶۱۵±۱/۴۷۳ b	۶۳/۱۴۲±۰/۵۹۴ a	۱۵۳/۴۲۸±۳/۷۹۱ b
تجربی ۵	n=۷	۱/۳۰۲±۰/۰۰۶ a	۶۳/۵۸۲±۲/۲۴۹ b	۶۳/۲۵۰±۰/۷۵۰ a	۱۴۹/۲۵۰±۶/۵۲۳ b
تجربی ۶	n=۷	۱/۲۹۷±۰/۰۰۴ a	۶۱/۵۰±۱/۷۰۷ b	۶۳/۷۵۰±۰/۴۷۸ a	۱۴۷/۰۰±۲/۴۸۳ b
تجربی ۷	n=۷	۱/۲۹۵±۰/۰۰۲ a	۳۹/۷۰±۲/۵۶۱ a	۸۱/۷۵۰±۲/۷۸۰ b	۸۴/۲۵۰±۴/۸۱۹ a
تجربی ۸	n=۷	۱/۲۸۵±۰/۰۰۵ a	۳۸/۱۲۵±۲/۷۲۶ a	۸۴/۵۰±۱/۹۳۶ b	۸۴/۵۰±۴/۴۰۶ a

جدول شماره ۲- مقایسه مقادیر میانگین±انحراف معیار اسپرم، سلول سرتولی، سلول لایدیگ، قطر مجرای داخلی، ضخامت اپی‌تلیوم زایا بین گروههای مختلف مورد مطالعه

گروهها	متغیرها	تعداد اسپرم	تعداد سلول سرتولی	تعداد سلول بینابینی	قطر مجرای داخلی به قطر منی‌ساز (mm)	ضخامت اپی‌تلیوم زایا (mm)
کنترل n=۷		۱۲۹/۴۴±۰/۴۲ bc	۲۲±۰/۵۷ a	۱۶±۰/۵۷ a	۰/۷±۰/۲ a	۰/۱۲۰±۰/۰۰۰۸ e
شم n=۷		۱۳۷/۶۰±۸/۸۹ c	۲۱/۳۰±۰/۴۸ a	۱۵/۳۰±۰/۶۶ a	۰/۶۵۹±۰/۶ a	۰/۱۲۲±۰/۰۰۰۳ e
تجربی ۱	n=۷	۱۲۱/۴۵±۱۶/۶۳ bc	۲۳/۶۶±۱/۲۶ a	۱۷/۵±۰/۸۶ a	۰/۶۷±۲۴/۲ a	۰/۱۲۱±۰/۰۰۰۹ e
تجربی ۲	n=۷	۱۲۰/۸۷±۱۰/۲۰ bc	۲۳/۳۳±۱/۲۸ a	۱۷/۴۱±۰/۷۱ a	۰/۶۹±۰/۰۴ a	۰/۱۲۰±۰/۰۰۰۴ e
تجربی ۳	n=۷	۱۱۵/۶۲±۱۴/۴۷ bc	۲۲/۶۶±۰/۹۱ a	۱۶/۰۸±۱/۶۱ a	۰/۷۲±۰/۰۲ a	۰/۱۱۸±۰/۰۰۰۴ de
تجربی ۴	n=۷	۱۱۱/۹۰±۶/۵۶ bc	۲۲/۶۱±۰/۴۹ a	۱۵/۰۴±۰/۹۲ a	۰/۷۲±۰/۰۵ a	۰/۱۱۸±۰/۰۰۰۱ de
تجربی ۵	n=۷	۱۰۸/۴۹±۲/۴۵ bc	۲۲/۲۵±۰/۷۵ a	۱۵/۰۲±۰/۰۲ a	۰/۷۷±۰/۰۰۵ a	۰/۱۱۷±۰/۰۰۰۴ ce
تجربی ۶	n=۷	۱۰۱/۵۸±۴/۲۸ bc	۲۲/۰±۱/۲۲ a	۱۵/۰±۰/۴۰ a	۰/۸۱±۰/۱۲ a	۰/۱۱۶±۰/۰۰۰۲ ce
تجربی ۷	n=۷	۶۹/۵۰±۳/۰۱ a	۲۱/۲۵۰±۰/۴۷ a	۱۴/۹۳±۰/۰۳ a	۱/۱۶۲±۰/۰۹ b	۰/۰۷۸±۰/۰۰۱ b
تجربی ۸	n=۷	۶۲/۵۰±۵/۲۰ a	۲۱/۰±۰/۷۰ a	۱۴/۹۰±۰/۰۵ a	۱/۱۶۴±۰/۵ b	۰/۰۷۵±۰/۰۰۰۴ b

گروههای دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری ندارد.

گروهها: تجربی ۱= کورکومین حداکثر، تجربی ۲= کورکومین متوسط، تجربی ۳= کورکومین حداقل

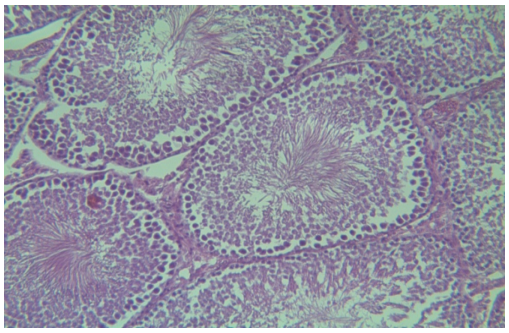
میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتید و اسپرماتوزوئید و ضخامت اپی‌تلیوم زایا در گروههای تحت اشعه و حلال + اشعه نسبت به گروه کنترل و شم کاهش معنی‌داری در سطح $P\leq ۰/۰۵$ نشان دادند. درمان با دوزهای متفاوت کورکومین در گروههای اشعه دیده از این کاهش جلوگیری کرده و اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل و شم نشان نمی‌دهد. در سایر گروههای تجربی هیچ اختلاف معنی‌داری نشان ندادند (جداول شماره ۱ و ۲).

میانگین تعداد سلولهای اسپرماتوسیت اولیه و نسبت قطر مجرای داخلی به قطر لوله منی‌ساز، در گروههای تحت اشعه و حلال + اشعه افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل و شم نشان می‌دهند ($P\leq ۰/۰۵$) و در سایر گروههای تجربی تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. درمان با دوزهای متفاوت کورکومین در گروههای تحت اشعه از این افزایش جلوگیری نمود (جداول ۱ و ۲).

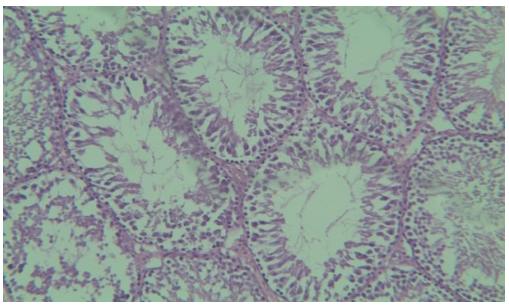
میانگین تعداد سلول سرتولی و تعداد سلول بینابینی در گروههای تحت اشعه و حلال + اشعه نسبت به گروه کنترل و شم تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. در سایر گروههای تجربی نیز تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل و شم مشاهده نگردید (جداول ۱ و ۲).

یافته‌های هیستوپاتولوژی در گروه کنترل و شم ساختار بافتی بیضه، مجاری منی ساز و اپی‌تلیوم زایای آن کاملاً منظم و طبیعی بود و لوله اسپرم ساز دارای اپی‌تلیوم زایا با ضخامت زیادی بوده و تمام انواع اسپرماتوژن‌ها و سلول سرتولی در اپی‌تلیوم لوله اسپرم ساز قابل مشاهده بود که همین امر قطر

اپی‌تلیوم را زیاد نموده. از طرفی قطر مجرای داخلی فضای کمی را تشکیل می‌دهد (شکل‌های ۱ و ۲).

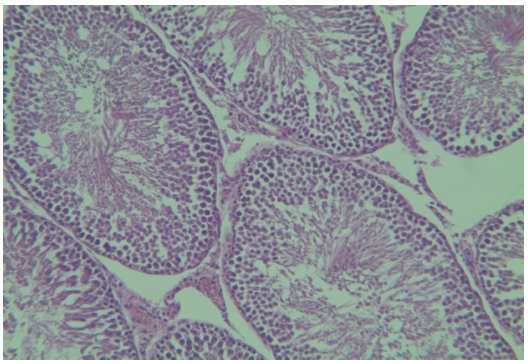


شکل ۱- فتومیکروگراف لوله‌های اسپرم ساز در گروه کنترل، رنگ‌آمیزی H & E، ۴۰×

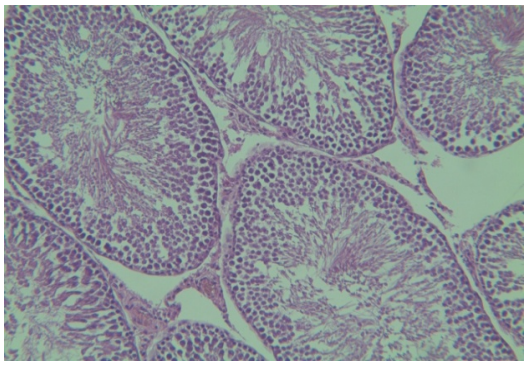


شکل۲- فتومیکروگراف لوله‌های اسپرم ساز در گروه شم، رنگ‌آمیزی H& E، ۴۰×

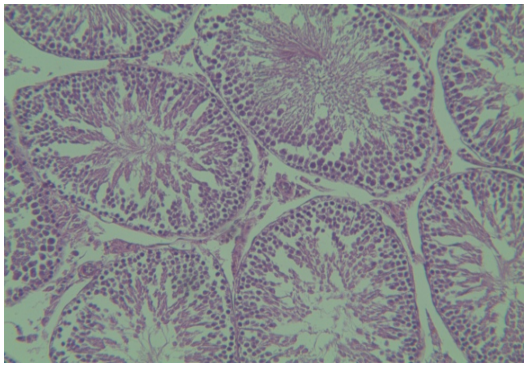
بافت بیضه حیوانات گروههای تجربی: کورکومین حداکثر، کورکومین متوسط، کورکومین حداقل، کورکومین حداکثر+اشعه، کورکومین متوسط+ اشعه، کورکومین حداقل+ اشعه از لحاظ ساختار هیستومورفولوژیکی تا حدود زیادی شبیه گروههای کنترل و شم می‌باشد (شکل ۸-۳).



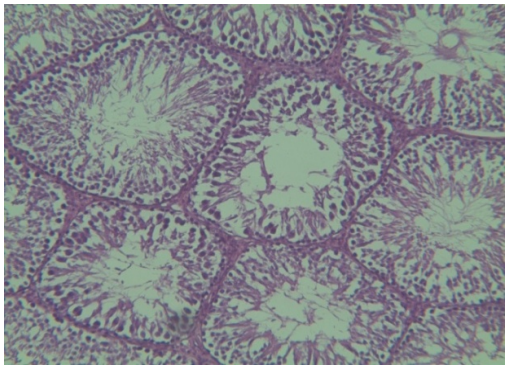
شکل ۳- فتومیکروگراف لوله های اسپرم ساز در گروه کورکومین حداکثر، رنگ‌آمیزی H & E، ۴۰×



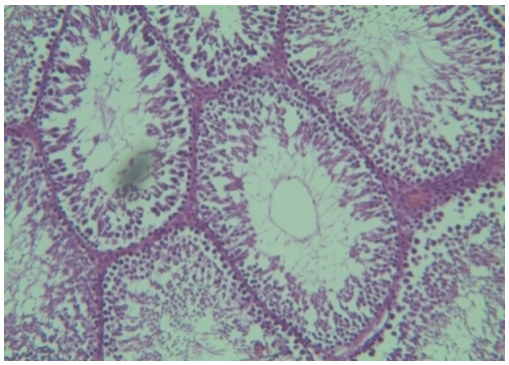
شکل ۴- فتومیکروگراف لوله‌های اسپرم ساز در گروه کورکومین متوسط، رنگ‌آمیزی H & E، ۴۰×



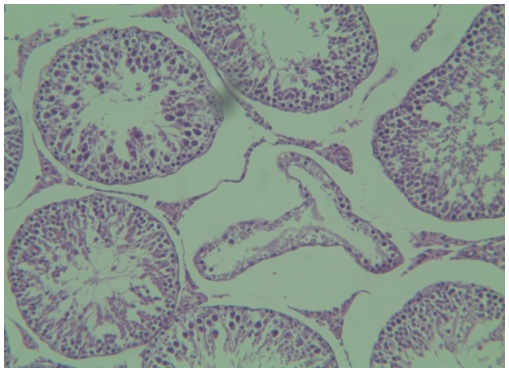
شکل ۵- فتومیکروگراف لوله‌های اسپرم ساز در گروه کورکومین حداقل، رنگ‌آمیزی H & E، ۴۰×



شکل ۶- فتومیکروگراف لوله‌های اسپرم ساز در گروه کورکومین حداکثر + اشعه ، رنگ‌آمیزی H & E، ۴۰×



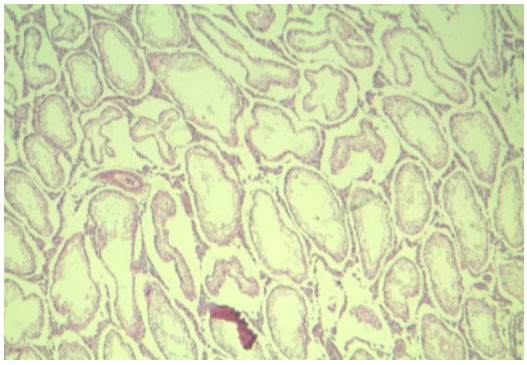
شکل ۷-فتومیکروگراف لوله‌های اسپرم ساز در گروه کورکومین متوسط +اشعه، رنگ‌آمیزی H & E، ۴۰×



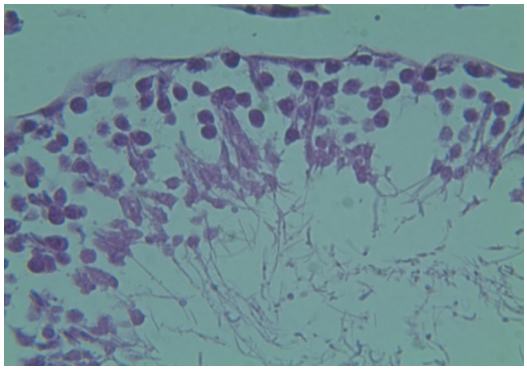
شکل ۸-فتومیکروگراف لوله‌های اسپرم ساز در گروه کورکومین حداقل + اشعه، رنگ‌آمیزی H & E، ۴۰×

در بررسی‌های بافت شناسی بیضه حیوانات در گروههای تجربی: کورکومین حداکثر+ اشعه، کورکومین متوسط+ اشعه، کورکومین حداقل+ اشعه سلولهای زایا به وضوح دیده شدند، در اکثر موارد دیده شده، سازمان‌بندی غشا پایه حفظ شده بود و اسپرماتوزوآی بالغ در داخل لومن لوله‌های اسپرم ساز مشاهده گردید. اکثر تغییرات تخریبی و بی‌نظمی‌های ایجاد شده توسط اشعه، با تجویز کورکومین با دزهای ۲۵ mg/ml، ۵۰ mg/ml، ۱۰۰mg/ml تعدیل یافته بود (شکل‌های ۸-۶). در هر دو گروه اشعه و حلال+اشعه، انواعی از اسپرماتوژن‌ها در لوله‌های اسپرم‌ساز از بین رفته‌اند و غشای پایه حالت از هم گسیختگی پیدا می‌کند و بی‌نظمی و تخریب در لایه اپی‌تلیوم زایا دیده می‌شود. همچنین به دلیل از بین رفتن انواع سلول‌های اسپرماتوژنیکی (اسپرماتوگونی‌ها، اسپرماتیدها، اسپرماتوزوآ) در این دوز پرتوی، در این لایه حفره‌دار شدگی قابل مشاهده بود (شکل‌های ۱۰ و ۱۱).

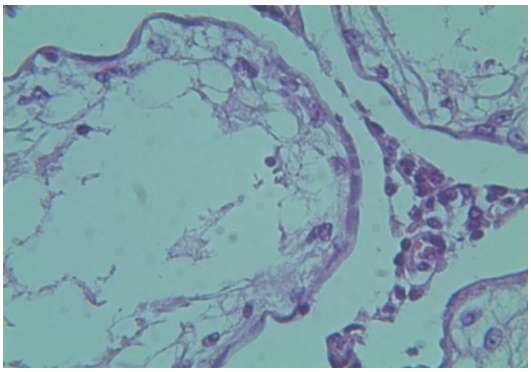
قطر مجرای داخلی نسبت به قطر لوله منی‌ساز، افزایش یافته بود. بافت همبند بینابینی از لحاظ تعداد سلولهای بینابینی تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل و شم نداشت و با توجه به فواصل زیاد لوله‌ها حالت ادم را نشان می‌دهد (شکل‌های ۱۲-۹).



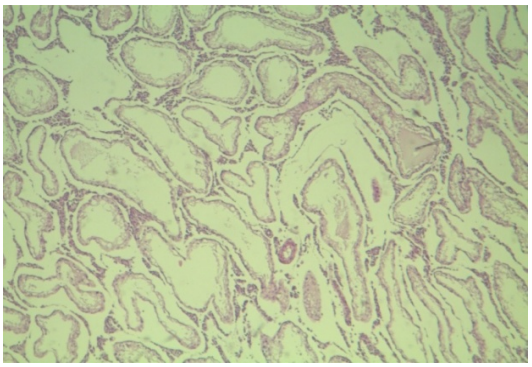
شکل ۹-فتومیکروگراف لوله‌های اسپرم ساز در گروه حلال + اشعه، رنگ‌آمیزی H & E، ۴۰×



شکل ۱۰-فتومیکروگراف اپی‌تلیوم زایا: حفره‌دارشدگی در گروه حلال + اشعه، رنگ‌آمیزی H & E، ۱۰۰×



شکل ۱۱-فتومیکروگراف اپی‌تلیوم زایا: حفره‌دارشدگی در گروه اشعه، رنگ‌آمیزی H & E، ۱۰۰×



شکل ۱۲ –فتومیکروگراف لوله های اسپرم ساز در گروه اشعه، رنگ‌آمیزی H & E، بی‌نظمی در لوله‌های اسپرم ساز و کنده شدن اپی‌تلیوم، ۴۰×

بحث و نتیجه‌گیری:

نتایج حاصل از تحقیق حاضر حاکی از تغییرات غیرطبیعی و تخریبی ساختار بافتی بیضه به صورت بی‌نظمی در اپی‌تلیوم منی‌ساز، کاهش در تعداد سلولهای دودمان اسپرماتوزوئید شامل اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید، اسپرماتوزوئید و تغییرات پاتولوژیک در اپی‌تلیوم زایا و افزایش قطر مجرای داخلی نسبت به قطر لوله منی‌ساز و حالت ادم در بافت همبند بینابینی در حیوانات گروههای اشعه و حلال+ اشعه می‌باشد. این تغییرات با گزارشات محققین دیگر که نشان دادند اشعه بر روی ساختار و عملکرد اندام‌های تولید مثلی موش‌های صحرایی نر اثرات تخریبی دارد، مطابقت دارد (۱۶،۱۷).

NF-Kappa B نوعی کمپلکس پروتئینی است که نسخه‌برداری DNA همه انواع سلولی را کنترل می‌کند و در پاسخ‌های سلولی به محرک‌هایی همچون استرس، سیتوکاین، گونه‌های اکسیژنی فعال (ROS)، تابش U.V، اکسیداسیون LDL و آنتی‌ژن‌های باکتریائی و ویروسی، کوکائین و پرتودهی یونیزان افزایش می‌یابد ،که بیان NF-KB سبب سرطان و التهاب می‌گردد (۱۸،۱۹). از طرفی، پروتئین کیناز فعال شده به واسطه میتوژن (MAPK) به عنوان تبدیل کننده محرک بیرونی به هسته به شمار می‌آید (۲۰). فاکتور NF-KB دارای اعضای مختلفی بوده که گیرنده‌های هسته‌ای هورمونی یکی از آنهاست (۲۱). به عبارتی این فاکتور در بافت بیضه، نقش مهمی در بیان گیرنده آندروژنی (AR) داشته و سبب افزایش سطح پروتئین و mRNA مربوط به AR می‌گردد (۲۲). P38-MAPK یکی از اعضای خانواده MAPK به شمار آمده که توسط انواعی از استرس‌های سلولی مانند استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش ROS فعال می‌شود. فعالیت P38-MAPK (نوعیMAPK) در تنظیم نسخه‌برداری فاکتورNF-KB و بیان آنزیم NO سنتتاز (NOS) نشان داده شده است (۲۳). نیتریک اکساید (NO) یک رادیکال آزاد است که بوسیله آنزیم NO سنتتاز سنتز می‌گردد (۲۴). NO با ROS برای مرگ سلولی لازماند (۲۵). NO آسیب سلولی را با کاهش سطح گلوتاتیون (GSH) درون سلولی افزایش می‌دهند (۲۶).

NF-KB برای فعالیت تعدادی از ژن‌ها از جمله NOS که تولید NO اضافی را می‌کند، لازم است (۲۷).

تابش پرتوهای یونیزان با اثرات غیرمستقیم مانند تشکیل رادیکال‌های آزاد و ایجاد استرس اکسیداتیو می‌تواند سبب اثرات مخرب زیستی و آسیب در مکانیسم‌های طبیعی سیگنالینگ سلولی گردد (۲۸). کورکومین اثرات رادیکال‌های آزاد اکسیژنی مانند آنیون‌های سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل را که نقش مهمی در آغاز پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو دارند، با افزایش بیان آنزیم‌های فراتنظیمی مانند کاتالاز، گلوتاتیون ترانسفراز (GST)، گلوتاتیون پراکسیداز (GSHPX)، سوپراکسیداز دسموتاز (SOD) و mRNA مربوط به آنها می‌کاهد (۲۹). کورکومین با مهار فعالیت پروتئین کیناز فعال شده به واسطه ی میتوژن (MAPK) و NO محافظت در مقابل آسیب پرتوی را فراهم می‌آورد (۱۲،۱۳،۲۹). کورکومین از فعالیت چندین فاکتور رونویسی که در سرطان‌زایی دخالت دارند، ممانعت می‌کند (۱۵). از جمله این فاکتورها: MAPK و NF-KB می‌باشد که کورکومین سبب مهار مسیرهای MAPK و-NF KB در برابر آسیب سلولی می‌گردد (۳۰).

همچنین مطالعات نشان می‌دهد که سلولهای قابل تقسیم نسبت به پرتوها حساس‌ترند (۳۱،۳۲). بنابراین در گروههای اشعه و اشعه + حلال، کاهش معنی‌دار تعداد سلولهای اسپرماتوگونی در مقایسه با گروه کنترل و شم مشاهده گردید.

تشعشعات گاما با تولید گونه‌های فعال رادیکالی و ایجاد شکست بر روی DNA سلولهای اسپرماتوسیت اولیه باعث توقف سیر تکاملی سلولها شده و از تبدیل سلولهای اسپرماتوسیت اولیه به رده بعدی جلوگیری می‌کند (۳۲).

از طرفی مطالعات نشان می‌دهد اسپرماتیدها و اسپرماتوزوآ نیز تا حدی به پرتوهای یونیزان حساسند (۳۱).

مطالعات Mettler در سال ۱۹۸۷ نشان داد در دوز پائین پرتودهی، سلولهای سرتولی و لایدیگ هیچ گونه تغییرات

هیستولوژیکی نشان ندادند. زیرا آنها نسبتاً مقاوم به پرتو هستند (۳۳).

بیضه‌ها یک سیستم آنتی‌اکسیدانی شامل تولیدات آنزیمی و غیرآنزیمی اند. تولیدات آنزیمی این سیستم دفاعی، به صورت القا استرس اکسیداتیو در بیضه به واسطه(اثر غیرمستقیم) NF-KB و القاکننده گونه‌های mRNA برای فعالیتهای سوپراکسید دسموتاز (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و گلوتاتیون – S– ترانسفراز (GST) مشخص شده است (۳۴). آنزیم SOD بوسیله سلولهای زایا و سرتولی تولید می‌شوند (۳۵). گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) نیز در میتوکندری، هسته‌ها و ناحیه آکروزومی اسپرماتوزوآی تمایز یافته، یافت می‌شود (۳۶).

فسفولیپید هیدروپراکسید GPX (PHGPX) از مهمترین ایزوفرم‌های GPX در بیضه ست که در سلولهای لایدیگ و اسپرماتوژنیک بیان می‌شوند (۳۷). از آنجایی که فرآیند اسپرماتوژنز فرآیندی است که تقسیم میتوز به وفور در آن دیده می‌شود، تابش گاما می‌تواند تأثیرات به سزایی در آن داشته باشد (۳۱).

مطالعات Daila در سال ۲۰۰۱ نشان داد که تابش پرتو گاما با دزهای ۰/۱، ۰/۵ و ۲ گری در طی ۱۵ هفته نیز تفاوت معنی‌داری در وزن موش‌های پرتودیده و پرتو ندیده نشان نداده که نتیجه آن با این تحقیق مطابقت دارد.

بنابراین در گروههای تجربی: کورکومین حداکثر + اشعه، کورکومین متوسط + اشعه، حداقل کورکومین + اشعه، تجویز کورکومین در گروههای تحت اشعه، با خواص آنتی‌اکسیدانی و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش اثرات رادیکالهای آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی سبب گردیده تا بافت بیضه از لحاظ تعداد انواع اسپرماتوژن‌ها و قطر لوله‌های منی‌ساز و مجرای داخلی آن و ضخامت اپی‌تلیوم زایا، به وضعیت طبیعی نزدیک شود و آسیب‌های وارد بر بافت بیضه ناشی از پرتودهی گاما با دوز ۲ گری را کاهش دهد.

در نتیجه می‌توان گفت: این مطالعه نشان می‌دهد که پرتو گاما با دوز ۲ گری بدون عوارض جانبی نبوده و آسیب‌های ساختاری بر بافت بیضه ایجاد می‌کند، همچنین مشخص شد که کورکومین با دوزهای ۲۵ mg/ml، ۵۰ mg/ml، ۱۰۰mg/ml بر استرس اکسیداتیو بافت بیضه ناشی از تابش پرتو، دارای اثر محافظتی می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که کورکومین می‌تواند به عنوان یک داروی محافظت‌کننده برای استفاده کلینیکی جهت پیشگیری از عقیمی در مردان تحت پرتودرمانی و افراد شاغل در اماکن تحت تشعشعات هسته‌ای مورد استفاده قرار بگیرد.

منابع
References

1. LawrenceTS. Principles and Practice of oncology. Philadelphia; 2008.
2. Brown D. Early of the screening program for radioprotectors. *Int J Radia Oncol Biol*. 1982;8:565-570.
3. Portess DI, Bauer G, Hill MAó, Neil P. Low-dose irradiation of nontransformed cells stimulates the selective removal of precancerous cells via intercellular induction of apoptosis. *Canser Res*. 2007;67:1246-1253.
4. Sies H. Oxidative Stress: Oxidative and Antioxidants. *Exp Phisiol*. 1997;82:291-295.
5. Jagetia GC. Radioprotective and Radiosensitization by curcumin. *Adv Exp Med Biolo*. 2007;595:301-320.
6. Free MJ, Schluntz GA, Jaffe RA. Respiratory gas tensions in tissues and fluids of the male rat reproductive tract. *Biol Reprod*. 1967;14:481-488.
7. Zangar RC, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;199:l316-1331.
8. Hosseinimehr SJ. Trends in the development of radioprotective agents. *Drug Discov Today*. 2007;12:794-805.

9. Pospisil M, Hofer M, Vacek A, Netiková J, Pipalová I, Viklická S. Noradernaline reduces cardiovascular effects of the combined dipyridamole and AMP administration but preserves radioprotective effects of these drugs on hematopoiesis in mice. *Physiol Res*. 1993;42:333-340.

10. Mozdarani H. Translated of Radiobiology for Radiologists. 1st ed. Tehran: Tarbiat Modarres University Press; 1990.

11. Jagatia G, Rajanikant GK. Curcumin treatment enhances the repair and regeneration wounds in mice hemi-body exposed to gamma-radiation. *Plast Reconstr Surg*. 2007;115:515-528.

12. Varadkar P, Dubey P, Krishna M, Verma N. Modulation of radiation-induced protein kinase C activity by phenolics. *J Radiol Prot*. 2001;21:361-370.

13. Khopde SM, Priyadarsini KI, Guha SN, Satar JG, Venkatesan P, Rao MN. Inhibition of rsdiation-induced lipid peroxidation by Tetrahydrocurcumin. Possible mechanisms by pulse radiolysis. *Biosci Biotechnol Biochem J*. 2000;64:503-509.

14. Subramania M, Sreejayan N, Rao MN, Devasagayam TP, Singh BB. Diminution of single oxygen-induced DNA-damage by J.K.Lin-shiaucurcumin and relaed antioxidants. *Mutat Res*. 1994; 311:249-255.

15. Biswas SK, Mcclure D, Jimenez LA, Meqson IL, Rahman I. Curcumin induces glutathione biosynthesis and inhibit NF-kappaB activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells. Mechanism of free radical scavenging activity. *Antioxid Redox Signa*. 2005;7:32-41.

16. Li N, Karin M. Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF-kappaB through two distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:13012-13017.

17. Ozgunar M, Koyu A, Cesur G, Ural M, Ozguner F, Gokcimen A, et al. Biological and morphological effects on reproductive organ of rats after exposure to electromagnetic field. *Saudi Med J*. 2005;26:405-410.

18. Porter KL, Shetty G, Meistrich ML. Testicular edema is associated with speratogonial arrest in irradiated rats. *Endocrinology*. 2006;147:1297-1305.

19. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappa B:a pivotal Transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Eng J Med*. 1997;336:1066-1071.

20. Gilmore TD. Introduction to NF-Kappa B: player, pathway, perspectives. *Oncogene*. 2006;25:6680-6684.

21. Hadad J. Mitogen-activated protein kinase and the evolution of Alzheimer's: a revolutionary neurogenetic axis for therapeutic intervention? *Prog Neurobiol*. 2004;73:359-377.

22. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol*. 2000;165:1013-1021.

23. Zhang L, Altuwaijri S, Deng F, Chen L, Lal P, Bhanot UK, et al. NF-KB regulates androgen receptor expression and prostate canser growth. *Am J Pathol*. 2009;175:489-499.

24. Chan WH, Wu CC, Yu JS. Curcumin inhibits UV irradiation-induced oxidative stress and apoptotic biochemical changes in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J Cell Biochem*. 2003;90:327-338.

25. Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis biological functions and puthophysiology. *Free Radic Res*. 1997;31:577-598.

26. Zaninotto F, La Camera S, Polverai A, Delledonne M. Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiol*. 2005;141:379-383.

27. Zhang C, Walker LM, Mayeux PR. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced oxidant stress in the rat kidney. *Biochempharmacol*. 2000;59:203-209.

28. Xie QW. Role of transcription factor NF-Kappa N/Re1 in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chen*. 1994;259:4705-4708.

29. Noorafshan A, Karbalay-Doust S, Valizadeh A, Aliabadi E, Mirkhani H. Ameliorative effects of curcumin on the seminiferous epithelium of curcumin on the seminiferous epithelium in metronidazole-treated mice: a stereological study. *Toxicol Pathol*. 2010;38:366-371.

30. Varadkar P, Dubey P, Krishna M, Verma N. Modulation of radiation-induced protein kinase C activity by phenolics. *J Radiol Prot*. 2001;21:361-370.

31. Subbotina TI, Tereshkina OV, Khadartsev AA, Yashin AA. Effect of low-intensity extremely high frequency radiation on reproductive function in wistar rats. *Bull Exp Biol Med*. 2006;142:189-190.

32. Erickson BH. Effect of continuous gamma-radiation on the stem and differentiating spermatogonia of the adult rat. *Muta Res*. 1978;52:117-128.

33. Mettler FA, Moseley RD. Medical effects of ionizing radiation. New York: WB. Sunders Press; 1978: 43-62.

34. Kaur P, Kaur G, Bansal MP. Tertiary-butyl hydroperoxide induced oxidative stress and male reproductive activity in mice: Role of transcription factor NF-kappa B and testicular antioxidant enzymes. *Reprod Toxicol*. 2006;22:479-484.

35. Ishii T, Matsaki S, Okada F, Toyosaki S, Tomita Y, Ikeda Y, et al. Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. *Free Radic Res*. 2005;39:697-705.

36. Vaisberg CN, Jelezarsky LV, Dioshlianova B, Chaushev TA. Activity, substrate detection and immunolocalization of glutathione peroxidase (GPx) in bovine reproductive organs and semen. *Theriogenology*. 2005;64:416-428.

37. Baek IJ, Seo DS, Yon JM, Lee SR, Jin Y, Nahm SS, et al. Tissue expression and cellular localization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) mRNA in male mice. *J Mol Histol*. 2007;38:237-244.