

Original Article

The Protective Effect of Quercetin on Sperm Parameters and Serum Biochemical Factors in Adult Mice Treated with Dexamethasone

Malek Soleimani Mehranjani^{1*}, Seyyedeh Masomeh Mohammadi¹

¹Department of Biology,
Faculty of Science, Arak
University, Arak, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Dexamethasone is a synthetic glucocorticoid, which causes oxidative stress in the testicular tissue. This study aimed to investigate the protective effect of quercetin as a powerful antioxidant on sperm parameters and serum biochemical factors in mature adult mice following the treatment with dexamethasone.

Methods: In this experimental study, 24 mature adult male NMRI mice, were randomly divided into 4 groups (n=6), including control group, group received dexamethasone (dose, 7mg/kg/day), group received quercetin (dose, 50mg/kg/day) and group received Dexamethasone+quercetin. Seven days after the treatment and intraperitoneal injection, the serum samples were collected to measure the testosterone level, total antioxidant capacity, and malondialdehyde level. The left testis was used to measure daily sperm production (DSP) and left caudal epididymis was cut in the Ham's F10 medium, then the released spermatozoa were used to analyze the sperm parameters and chromatin quality. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's test at a significance level of $p < 0.05$.

Results: In this experimental study, a significant decrease was observed in the mean sperm count, viability, normal morphology, motility, and daily sperm production, serum testosterone level and total antioxidant capacity and a significant increase was seen in the malondialdehyde (MDA) level in the dexamethasone group compared to the control group. In the dexamethasone+quercetin group, the mentioned parameters were compensated to the extent of the control level.

Conclusion: The results of this study showed that quercetin, as a strong antioxidant, could ameliorate the adverse effects of dexamethasone on sperm parameters and serum biochemical factors in mice.

Keywords: Dexamethasone; DNA integrity; Quercetin; Sperm parameters; Spermatozoa.
DOI: 10.29252/qums.13.2.27

*Corresponding Author:
Malek Soleimani
Mehranjani; Department of
Biology, School of Basic
Sciences, Arak University,
Arak, Iran.

Email:
m-soleimani@araku.ac.ir

Received: 8 Dec, 2018
Accepted: 3 Feb, 2019

اثر حفاظتی کوئرستین بر پارامترهای اسپرم و فاکتورهای بیوشیمیایی سرم در موش‌های بالغ پس از تیمار با دگزامتازون

ملک سلیمانی مهرانجانی^{۱*}، سیده معصومه محمدی^۱

چکیده

زمینه و هدف: دگزامتازون یک گلوکوکورتیکوئید مصنوعی است که باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت بیضه می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر حفاظتی کوئرستین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی بر پارامترهای اسپرم و فاکتورهای بیوشیمیایی سرم در موش‌های بالغ پس از تیمار با دگزامتازون بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۲۴ سر موش نر بالغ NMRI به صورت تصادفی به چهار گروه (n=6) شامل: گروه کنترل، گروه دریافت‌کننده دگزامتازون (دوز ۷ میلی گرم بر کیلوگرم در روز)، دریافت‌کننده کوئرستین (دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم در روز) و گروه دریافت‌کننده دگزامتازون + کوئرستین تقسیم شدند. ۷ روز پس از تیمار و تزریق داخل صفاقی، نمونه‌های سرم برای اندازه‌گیری سطح تستوسترون، ظرفیت کل آنتی‌اکسیداتی و سطح مالون‌دی‌آلدئید جمع‌آوری شدند. بیضه چپ جهت اندازه‌گیری تولید روزانه اسپرم و ناحیه دمی اپیدیدیم چپ در محیط کشت Ham's F10 قطعه‌قطعه شد، سپس از اسپرم‌های خارج‌شده برای بررسی پارامترهای اسپرم و کیفیت کروماتین استفاده گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه و توکی، در سطح معنی‌داری، $p < 0.05$ آنالیز شدند.

یافته‌ها: در این مطالعه تجربی، کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد، حیات، اشکال طبیعی، تحرک و تولید روزانه اسپرم، سطح تستوسترون و ظرفیت کل آنتی‌اکسیداتی و افزایش معنی‌داری در سطح مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در گروه دگزامتازون در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید. پارامترهای ذکرشده در گروه کوئرستین + دگزامتازون، در حد گروه کنترل جبران شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد کوئرستین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی می‌تواند اثرات نامطلوب دگزامتازون بر پارامترهای اسپرم و فاکتورهای بیوشیمیایی سرم در موش را جبران کند.

کلیدواژه‌ها: دگزامتازون؛ تمامیت DNA؛ کوئرستین؛ پارامترهای اسپرمی؛ اسپرماتوزوا.

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

ملک سلیمانی مهرانجانی؛ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:

m-soleimani@araku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۱۷

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۱۴

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Soleimani Mehranjani M, Mohammadi SM. The protective effect of quercetin on sperm parameters and serum biochemical factors in adult mice treated with dexamethasone.

Qom Univ Med Sci J 2019;13(2):27-38. [Full Text in Persian]

مقدمه

امروزه، بیش از ۶۰ میلیون نفر از مردم جهان با مشکلات ناباروری در زندگی مشترک مواجه‌اند؛ این در حالی است که در نیمی از موارد مردان به‌نحوی عامل ناباروری هستند (۱). مشخص شده است سه عامل مؤثر در ناباروری مردان شامل: کاهش تعداد، قدرت تحرک و شکل غیرطبیعی اسپرم است؛ لذا بررسی فاکتورهای مؤثر بر این سه عامل اصلی ناباروری در مردان بسیار حایز اهمیت است (۱، ۲). تغذیه، داروها، هورمون‌ها و متابولیت‌های آن، آلاینده‌های زیست‌محیطی و اشعه ایکس از این فاکتورهای مهم محسوب می‌شوند که ممکن است مراحل اسپرماتوژنز را نیز تحت تأثیر قرار داده و یا تخریب کنند (۲). گلوکوکورتیکوئیدها از جمله دگزامتازون، ترکیبات استروئیدی هستند که اثرات خود را از طریق گیرنده‌های داخل سلولی اعمال کرده و به‌طور گسترده به‌عنوان داروی ضدالتهاب، ضدتب و سرکوب‌کننده سیستم ایمنی مورد استفاده قرار می‌گیرند، همچنین با تأثیر بر سیستم تولیدمثلی منجر به القای استرس اکسیداتیو در بافت بیضه، کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانتی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شوند (۳-۵). استرس اکسیداتیو از طریق تحریک ترشح هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی باعث افزایش ترشح GnIH (Inhibitory Hormone Gonadotropin) شده که به‌نوبه خود باعث کاهش ترشح هورمون تستوسترون و مهار روند اسپرماتوژنز در بیضه پستانداران می‌شود؛ بنابراین دگزامتازون به‌عنوان یکی از آگونیست‌های گلوکوکورتیکوئیدی با تحریک ترشح GnIH، مهار تولید تستوسترون و توقف روند اسپرماتوژنز باعث کاهش تعداد سلول‌های جنسی می‌گردد (۳). علاوه بر این، دگزامتازون از طریق تأثیر بر روی بیان پروتئین‌های پیش‌آپتوزی سلول‌های زایا و ایجاد آپتوز در آن‌ها باعث اختلال در روند اسپرماتوژنز می‌شود (۶). محققان گزارش داده‌اند کاهش سطح تستوسترون، کاهش تحرک و حیات اسپرم، تخریب لوله‌های منی‌ساز، افزایش بافت بینابینی، کاهش ضخامت غشای پایه، افزایش واکوئل‌زایی در اپی‌تلیوم زایشی بیضه، افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی، از اثرات مخرب دگزامتازون بر دستگاه تولیدمثلی نر می‌باشد (۳، ۷، ۸).

کوثرستین یکی از مهم‌ترین فلاونوئیدهای پلی‌فنلی است که ازجمله اثرات آن می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانتی، کاهش سطح مارکرهای التهابی پلاسما و اثرات ضد سرطانی آن اشاره کرد (۹-۱۱). کوثرستین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی از طریق کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون پراکسیداز، گلوکاتایون - اس - ترانسفراز، سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز باعث کاهش استرس اکسیداتیو شده و از مرگ سلول‌های زایا در مراحل مختلف رشد و نمو و کاهش تعداد اسپرم جلوگیری می‌کند و باعث بهبود کیفیت اسپرم می‌شود (۱۲، ۱۳). لذا با توجه به تأثیر دگزامتازون در القای استرس اکسیداتیو و کاهش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و اثر نامطلوب بر اسپرم؛ در این مطالعه به بررسی اثر کوثرستین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت بر پارامترهای اسپرم و فاکتورهای بیوشیمیایی سرم در موش‌های تحت تیمار با دگزامتازون پرداخته شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، از موش‌های بالغ نر نژاد NMRI (با میانگین وزنی 36 ± 2 گرم) خریداری شده از انستیتو پاستور تهران - ایران استفاده شد. موش‌ها در قفس‌های پلاستیکی در اتاق حیوانات دانشگاه اراک تحت شرایط استاندارد (درجه حرارت 21 ± 2 درجه سانتیگراد، نور کنترل شده ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی) با دسترسی کامل به آب و غذا نگهداری شدند. در این پژوهش، کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. موش‌های بالغ به ۴ گروه ۶ تایی شامل: ۱- گروه کنترل (دریافت‌کننده نرمال‌سالین)؛ ۲- گروه دریافت‌کننده دگزامتازون با دوز ۷ میلی‌گرم برکیلوگرم (شرکت سیگما، آمریکا) (۵)؛ ۳- گروه دریافت‌کننده کوثرستین با دوز ۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم (شرکت سیگما، آمریکا) (۱۴) و ۴- گروه دریافت‌کننده دگزامتازون + کوثرستین (با دوز ۷ میلی‌گرم برکیلوگرم + ۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم) تقسیم شدند. تیمارها به‌صورت تزریق داخل صفاقی و به مدت ۷ روز انجام شد. بعد از پایان دوره تیمار، موش‌ها با دی‌اتیل اتر بیهوش و پس از کالبدشکافی، با باز کردن اسکروتوم، ابتدا ناحیه دمی اپیدیدیم چپ جهت بررسی آنالیزهای اسپرم جدا گردید، سپس نمونه‌های خون به‌وسیله سرنگ‌های

استریل به صورت مستقیم از قلب جمع‌آوری شدند و پس از اتمام خونگیری، پلاسمای نمونه‌های خونی با عمل سانتریفوژ (به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰g) از سرم جدا و نمونه‌های سرم جهت اندازه‌گیری سطح هورمون تستوسترون، ظرفیت کل آنتی‌اکسیدان‌ی و سطح مالون‌دی‌آلدئید (MDA) مورد استفاده قرار گرفتند. در ادامه، بیضه چپ از بدن خارج و به فلاسک حاوی نیتروژن مایع به مدت ۱۰ دقیقه منتقل گردید تا بافت بیضه یخ بزند، سپس بافت یخ‌زده در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد تا خاصیت یخ‌زدگی آن حفظ گردد. از این بیضه برای تولید روزانه اسپرم استفاده شد.

اپیدیدیم خارج شده از هر حیوان به پلیت حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت Ham's10 انتقال یافت و به منظور خروج اسپرم‌ها به درون محیط کشت به قطعات کوچکی بریده شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه، یک میلی‌لیتر از مخلوط محیط کشت و اسپرم با ۹ میلی‌لیتر فرمالین ۲٪ رقیق و فیکس شد. شمارش سرهای اسپرم با استفاده از لام هموسیستمتر (نئوبار) انجام گرفت، سپس تعداد اسپرم در واحد میلی‌لیتر محاسبه گردید. شمارش اسپرم‌ها براساس دستورالعمل سازمان جهانی سلامت (World Health Organization, WHO) انجام شد (۱۵).

جهت سنجش قابلیت حیات اسپرم، براساس دستورالعمل WHO، رنگ‌آمیزی ائوزین - نکروزین صورت گرفت. به‌طور خلاصه، ائوزین (۱٪)، مرک-آلمان) و نکروزین (۱۰٪، مرک -آلمان) در نرمال‌سالین آماده شد؛ بدین ترتیب که ابتدا نسبت یک حجم سوسپانسیون اسپرم (مخلوط محیط کشت و اسپرم) و دو حجم ائوزین در میکروتیوب مخلوط و پس از ۳۰ ثانیه نگهداری در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد، حجم مساوی از محلول نکروزین به مخلوط ساخته شده (سوسپانسیون اسپرم + ائوزین) اضافه و گسترش نازکی از نمونه بر روی لام تهیه گردید. پس از خشک شدن گسترش، با استفاده از میکروسکوپ نوری

(Olympus, BX51) با بزرگنمایی ۱۰۰×، تعداد ۱۰۰ اسپرم شمارش شد و نسبت درصد اسپرم‌های زنده در گروه‌های مختلف محاسبه گردید. در این رنگ‌آمیزی، سر اسپرم‌های زنده سفید بود؛ درحالی‌که سر اسپرم‌های مرده، قرمز شد (۱۵). به منظور بررسی شکل اسپرم، لام‌های ائوزین - نکروزین تهیه شده برای مطالعه

قابلیت حیات اسپرم مورد استفاده قرار گرفت. برای هر نمونه، ۱۰۰ اسپرم با بزرگنمایی ۱۰۰× میکروسکوپ نوری (Olympus, BX51)، بررسی و میزان ناهنجاری‌ها به صورت درصد بیان شد.

سنجش قابلیت تحرک اسپرم براساس دستورالعمل WHO انجام گرفت؛ بدین ترتیب که ابتدا ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون محیط کشت و اسپرم روی لام نئوبار منتقل و حرکات اسپرم در گروه‌های مختلف در زیر میکروسکوپ نوری

(Olympus, BX51) با بزرگنمایی ۲۰۰× بررسی شد. حداقل پنج میدان دید میکروسکوپ برای تعیین قابلیت تحرک ۲۰۰ اسپرم برای هر موش بررسی و درصد اسپرم‌های دارای حرکات پیش‌رونده، حرکت درجا و بدون حرکت (ساکن) محاسبه گردید (۱۵). پس از خروج بیضه چپ و حذف کپسول آن، پارانشیم بیضه به وسیله دستگاه هموژنایزر به مدت ۴ دقیقه در ۲ میلی‌لیتر نرمال‌سالین هموژن شد، سپس از سوسپانسیون حاصل، رقت ۰/۰۱ تهیه و ۱۰ میکرولیتر روی لام نئوبار قرار گرفت و به وسیله میکروسکوپ نوری (Olympus, BX51) تعداد اسپرم‌ها با بزرگنمایی ۴۰ شمارش شد (۱۶). در ادامه، ابتدا از مخلوط محیط کشت و اسپرم، گسترش‌های نازکی بر روی لام تهیه و در درجه حرارت اتاق خشک شدند. جهت ارزیابی تمامیت

DNA (DNA integrity)، گسترش‌های اسپرم به وسیله آکریدین اورانژ رنگ‌آمیزی شدند، سپس به طور خلاصه گسترش‌ها در محلول فیکساتور متانول (۳ قسمت) / اسید استیک گلاسیال (۱ قسمت) به مدت ۱۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد تثبیت و با محلول آکریدین اورنژ (۱۹٪ در بافر سیترات فسفات، pH=۲/۵) برای ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. لام‌ها به وسیله آب مقطر برای ۵ دقیقه به آرامی شست‌وشو داده شده و در دمای آزمایشگاه خشک شدند. سپس لام‌های رنگ‌آمیزی شده به وسیله میکروسکوپ فلورسنس با بزرگنمایی ۱۰۰۰× مورد بررسی قرار گرفتند. سه طرح رنگ‌آمیزی شده در سرهای اسپرم مورد توجه قرار گرفت: اسپرم‌های با سر سبز، نشان‌دهنده DNA دو رشته‌ای یا سالم (double-stranded DNA) و اسپرم‌های با سر زرد و قرمز، نشان‌دهنده DNA تک رشته‌ای یا دناتوره شده (Single-stranded DNA) بودند.

خوانده شده و x برابر با غلظت) به دست آمد. برای سنجش FRAP بافت گروه‌های مختلف، از فرمول رگرسیون:

$$y = 0.6333x + 0.1013$$

حاصل از منحنی استاندارد استفاده شد.

روش انجام آزمایش FRAP بدین گونه بود که ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از پلاسما در کووت‌ها ریخته شد، سپس مقدار ۳ میلی‌لیتر از معرف آماده FRAP به کووت‌ها اضافه و پس از ۴ دقیقه، جذب آن‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر در مقابل بلانک خوانده شد. در ادامه، با استفاده از فرمول رگرسیون حاصل در منحنی استاندارد، میزان FRAP نمونه‌های خونی برحسب میکرومول برلیتر محاسبه گردید.

نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف اعمیاری برای نمونه‌های موجود در هر گروه بیان شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه همراه با آزمون توکی در سطح معنی‌داری، $p < 0.05$ آنالیز شدند.

یافته‌ها

در این مطالعه، میانگین تعداد اسپرم در گروه دگزامتازون نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی‌داری داشت ($p < 0.001$). همچنین میانگین تعداد اسپرم در گروه دگزامتازون + کوثرستین در مقایسه با گروه دگزامتازون، افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.001$). در مقایسه میانگین تعداد اسپرم در گروه کوثرستین نسبت به گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$) (جدول شماره ۱).

میانگین درصد اسپرم زنده که معادل قابلیت حیات اسپرم است در گروه دگزامتازون در مقایسه با گروه کنترل، به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0.001$). قابلیت حیات اسپرم در گروه دگزامتازون + کوثرستین در مقایسه با گروه دگزامتازون، افزایش معنی‌داری را در حد گروه کنترل نشان داد ($p < 0.001$). از مقایسه میانگین درصد قابلیت حیات اسپرم در گروه کوثرستین نسبت به گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$). میانگین درصد اسپرم‌ها با شکل طبیعی در گروه دگزامتازون در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.001$). در گروه دگزامتازون + کوثرستین میزان شکل طبیعی اسپرم نسبت به گروه دگزامتازون، به طور معنی‌داری در حد گروه کنترل افزایش یافت ($p < 0.001$).

در هر لام حداقل ۱۰۰ اسپرم شمارش شد تا درصد اسپرم‌های دو رشته‌ای و تک‌رشته‌ای تعیین گردد (۱۵). به منظور کنترل روش مذکور، از نمونه‌های کنترل مثبت استفاده شد. بدین منظور پس از گرفتن نمونه‌های اسپرم از حیوان سالم و بالغ، DNA اسپرم‌ها تحت تأثیر حرارت بالا (۹۰ درجه سانتیگراد) به مدت ۳۰ دقیقه دناتوره شد و پس از تهیه گسترش، نمونه‌ها به روش اشاره شده در بالا، رنگ‌آمیزی شدند. در ادامه، ابتدا محلول TCA-TBA-HCL (شامل: تری کلرواستیک اسید TCA ۱۵٪ (گرم بر میلی‌لیتر)، تیوباریوتیک اسید (TBA) ۳۷۵٪ (گرم بر میلی‌لیتر) و اسید کلریدریک ۲۵٪ نرمال) تهیه شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه با ۱ میلی‌لیتر از محلول TCA-TBA-HCL مخلوط و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری (حمام آب جوش) قرار داده شدند. بعد از خارج کردن نمونه‌ها از بن‌ماری، نمونه‌ها به سرعت با استفاده از آب سرد، خنک شده و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع رویی به دقت جدا و جذب آن در ۵۳۲ نانومتر در برابر Blank (حاوی تمام ترکیبات به استثنای نمونه) قرائت گردید. غلظت مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از ضریب خاموشی آن:

$$\text{Cm}^{-1} = 1/56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$$

محاسبه و برحسب نانومول بر میلی‌لیتر بیان گردید (۱۷). سنجش میزان غلظت تستوسترون خون، مطابق دستورالعمل کیت ELISA (شرکت DRG آلمان) انجام گرفت. در این مرحله، نمونه‌ها در چاهک ریخته شدند، سپس محلول تستوسترون و محلول آنتی‌تستوسترون اضافه گردید و به مدت ۹۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد.

در ادامه، چاهک‌ها با آب دیونیزه شست‌وشو داده شدند و سوبسترا به هر چاهک افزوده شد و برای مدت ۲۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس با افزودن محلول متوقف‌کننده، واکنش پایان یافت و جذب آن در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

(Testosterone ELISA kit, Cat No EIA-1559, DRG International, Inc).

در مرحله بعدی، ابتدا از محلول استاندارد آهن ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) با غلظت ۱ میلی‌مول، رقت‌های مختلف تهیه شد، سپس منحنی استاندارد سولفات آهن در آزمایش FRAP رسم گردید. در ادامه، فرمول رگرسیون حاصل از منحنی استاندارد (y برابر با جذب

در مقایسه میانگین درصد شکل طبیعی اسپرم در گروه کوثرستین نسبت به گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$). میانگین تولید روزانه اسپرم در گروه دگزامتازون نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0/001$). از مقایسه میانگین تولید روزانه اسپرم در گروه کوثرستین نسبت به گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$) (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین تعداد، قابلیت حیات، شکل طبیعی و تولید روزانه اسپرم در گروه‌های مختلف موش، پس از ۷ روز تیمار با دگزامتازون (۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز) و کوثرستین (دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز).

گروه‌ها	تعداد اسپرم $10^6 \times$	p	قابلیت حیات اسپرم (درصد)	p	شکل طبیعی اسپرم (درصد)	p	تولید روزانه اسپرم (روز/گرم بیضه $\times 10^6$)	p
کنترل	$9/48 \pm 1/00$		$6/99 \pm 77/03$		$1/22 \pm 88/47$		$1/45 \pm 27/21$	
دگزامتازون	$6/81 \pm 1/00$	$< 0/001$	$2/95 \pm 59/54$	$< 0/001$	$5/26 \pm 40/74$	NS	$1/43 \pm 18/22$	$< 0/001$
دگزامتازون + کوثرستین	$9/17 \pm 0/65$	$< 0/001$	$1/93 \pm 73/07$	NS	$1/48 \pm 85/76$	NS	$0/89 \pm 27/11$	NS
کوثرستین	$10/49 \pm 0/51$	NS	$2/10 \pm 79/55$	NS	$1/36 \pm 90/39$	NS	$1/30 \pm 29/15$	NS

مقادیر p نسبت به گروه کنترل مقایسه و بیان شده‌اند. NS بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد است. داده‌ها براساس میانگین + انحراف معیار می‌باشد.

کاهش معنی‌داری در میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکت جلورونده در گروه دگزامتازون نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید ($p < 0/05$). در گروه دگزامتازون + کوثرستین، افزایش معنی‌داری در میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکت جلورونده نسبت به گروه دگزامتازون و در حد گروه کنترل دیده شد ($p < 0/001$). میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکت جلورونده در گروه کوثرستین مانند گروه کنترل بود و تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها دیده نشد ($p > 0/05$).

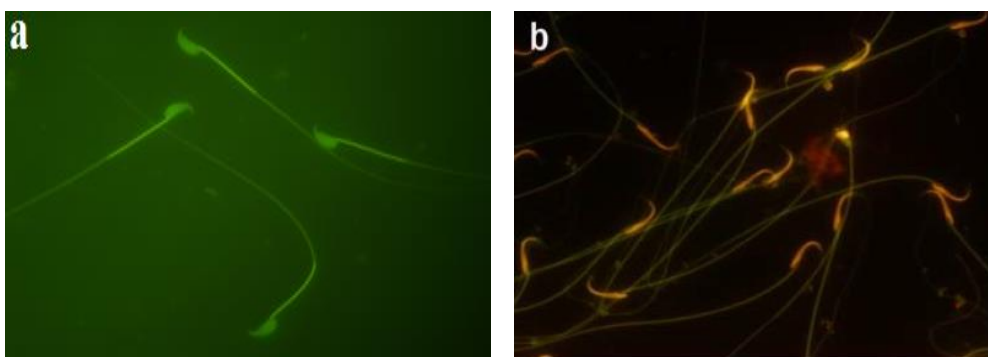
جدول شماره ۲: مقایسه میانگین قابلیت تحرک اسپرم در گروه‌های مختلف موش پس از ۷ روز تیمار با دگزامتازون (۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز) و کوثرستین (۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز).

گروه‌ها	بدون حرکت (درصد)	p	حرکت درجا (درصد)	p	حرکت جلورونده (درصد)	p
کنترل	$13/34 \pm 2/02$		$17/41 \pm 2/59$		$70/63 \pm 1/96$	
دگزامتازون	$13/11 \pm 2/84$	$< 0/001$	$22/36 \pm 1/42$	$< 0/001$	$49/78 \pm 1/04$	$< 0/001$
دگزامتازون + کوثرستین	$12/37 \pm 3/07$	NS	$16/73 \pm 2/91$	NS	$69/28 \pm 1/11$	NS
کوثرستین	$11/16 \pm 3/90$	NS	$13/28 \pm 2/18$	NS	$72/66 \pm 1/14$	NS

مقادیر p نسبت به گروه کنترل مقایسه و بیان شده‌اند. NS بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد است. داده‌ها براساس میانگین + انحراف معیار می‌باشد.

رنگ‌آمیزی گسترش‌های اسپرمی با آکریدین اورنژ نشان داد تیمار موش‌ها با دگزامتازون در مقایسه با گروه کنترل، تأثیری بر دنا توره شدن ساختمان دو رشته‌ای DNA اسپرم نداشته است؛ به‌طوری‌که سر اسپرم‌ها در موش‌های گروه دگزامتازون به رنگ سبز نمایان شد (شکل: a).

نمونه‌های کنترل مثبت سر اسپرم‌ها در گروهی که DNA آن‌ها توسط حرارت بالا دنا توره شده بودند به رنگ نارنجی ظاهر شد (شکل: b).



شکل: ارزیابی تمامیت DNA اسپرم‌های موش و بررسی سنجش میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) سرم.

(a) اسپرم‌ها با سر سبز رنگ، نشان‌دهنده DNA طبیعی و دست‌نخورده در گروه تیمار شده با دگزامتازون (۷ میلی گرم بر کیلوگرم در روز) به مدت ۷ روز است. (b) نمونه کنترل مثبت اسپرم‌های با سر نارنجی، بیانگر اسپرم‌هایی است که DNA آن‌ها توسط حرارت بالا دناتوره شده است. رنگ آمیزی آکریدین اوران با بزرگنمایی $\times 100$

از مقایسه سطح تستوسترون سرم در گروه کوثرستین نسبت به گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$) (جدول شماره ۳).

کاهش معنی‌داری در میانگین ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانتی در گروه دگزامتازون نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0.001$). از طرفی، سطح ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانتی در گروه دگزامتازون+کوثرستین نسبت به گروه دگزامتازون، به‌طور معنی‌داری (در حد گروه کنترل) افزایش یافت ($p < 0.001$). از مقایسه سطح ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانتی در گروه کوثرستین نسبت به گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$) (جدول شماره ۳).

افزایش معنی‌داری در میانگین میزان مالون‌دی‌آلدئید سرم در گروه دگزامتازون نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید ($p < 0.001$). میزان MDA در گروه دگزامتازون+کوثرستین نسبت به گروه دگزامتازون به‌طور معنی‌داری در حد گروه کنترل کاهش یافت ($p < 0.001$). از مقایسه میزان مالون‌دی‌آلدئید سرم در گروه کوثرستین نسبت به گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$) (جدول شماره ۳).

کاهش معنی‌داری در میانگین سطح تستوسترون سرم در گروه دگزامتازون نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید ($p < 0.001$). از طرفی، سطح هورمون تستوسترون در گروه دگزامتازون+کوثرستین نسبت به گروه دگزامتازون به‌طور معنی‌دار (در حد گروه کنترل) افزایش یافت ($p < 0.001$).

جدول شماره ۳: مقایسه میانگین مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، سطح هورمون تستوسترون و ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانتی سرم در گروه‌های مختلف موش پس از ۷ روز تیمار با دگزامتازون (۷ میلی گرم بر کیلوگرم در روز) و کوثرستین (۷ میلی گرم بر کیلوگرم در روز)

گروه‌ها	میزان مالون‌دی‌آلدئید سرم (نانومول بر میلی لیتر)	p	سطح تستوسترون سرم (نانوگرم بر میلی لیتر)	p	ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانتی (میکرومول بر لیتر)	p
کنترل	2.84 ± 0.62		0.74 ± 0.13		0.66 ± 0.14	
دگزامتازون	3.90 ± 0.56	< 0.001	0.26 ± 0.62	< 0.001	0.33 ± 0.12	< 0.001
دگزامتازون+کوثرستین	2.64 ± 0.58	NS	0.68 ± 0.91	NS	0.60 ± 0.06	NS
کوثرستین	2.01 ± 0.34	NS	0.83 ± 0.11	NS	0.75 ± 0.06	NS

مقادیر p نسبت به گروه کنترل، مقایسه و بیان شده‌اند. NS بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد است. داده‌ها بر اساس میانگین+انحراف معیار است.

بحث

در مطالعه حاضر، میانگین تعداد و تولید روزانه اسپرم در گروه دگزامتازون نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی‌داری نشان داد. از عوامل کاهش تعداد اسپرم در گروه دگزامتازون می‌توان به کاهش جمعیت سلول‌های اسپرماتوژنیک، کاهش اسپرمیوژن و کاهش هورمون تستوسترون اشاره کرد (۱۸،۸). تستوسترون نقش مهمی در تکامل و تمایز سلول‌های اسپرم دارد و کاهش سطح این هورمون باعث اختلال در فرآیند اسپرماتوژن می‌شود (۱۹). دگزامتازون می‌تواند از طریق مکانیسم‌های متعددی همچون ممانعت از فعالیت ۳- بتا هیدروکسی استروئید دهیدروناز (3βHFD)، استروئید ۱۷- آلفا - مونو اکسیژناز (p450c17)، همچنین با تأثیر مستقیم بر روی سلول‌های لایدیگ باعث کاهش سطح تستوسترون پلازما شود (۲۰). به‌طور کلی، پتانسیل تولید روزانه اسپرم به دو پارامتر مهم بستگی دارد که می‌توان به تعداد سلول‌های سرتولی و تعداد سلول‌های جنسی اشاره کرد (۲۱)؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت دگزامتازون با القای استرس اکسیداتیو و ایجاد آپوپتوز در سلول‌های اسپرماتوژنیک و نیز کاهش غلظت تستوسترون موجب اختلال در فرآیند اسپرماتوژن، کاهش تعداد اسپرم و تولید روزانه اسپرم می‌شود.

در مطالعه حاضر میانگین تعداد و تولید روزانه اسپرم در گروه دگزامتازون + کوثرستین در مقایسه با گروه کنترل، تغییر معنی‌داری نداشت؛ به عبارت دیگر، کوثرستین توانست از اثرات مخرب دگزامتازون بر پارامترهای مذکور بکاهد و میزان آن را به حد کنترل برساند. همچنین در مطالعه‌ای که توسط Omair و همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام گرفت تیمار رت‌های نر آلینو با کوثرستین توأم با سرب منجر به افزایش تعداد اسپرم نسبت به گروه تیمار شده با سرب گردید (۲۲). کوثرستین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی از مکانیسم‌های مختلفی برای جلوگیری و مقابله با استرس اکسیداتیو و آپوپتوز استفاده می‌کند؛ به‌طورمثال کوثرستین دارای خاصیت خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) بوده و با اهدای یک الکترون به رادیکال‌های آزاد، آن‌ها را به حالت پایدار درمی‌آورد و واکنش زنجیره‌ای الکترون را متوقف می‌کند (۱۲). در مطالعه حاضر، میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکت جلورونده در گروه دگزامتازون نسبت به گروه

کنترل، کاهش معنی‌داری یافت. همچنین افزایش معنی‌داری در میانگین درصد اسپرم‌های متحرک درجا و ساکن در گروه دگزامتازون نسبت به گروه کنترل دیده شد. عوامل مختلفی می‌توانند باعث کاهش حرکت اسپرم‌ها شوند، از جمله این عوامل می‌توان به رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) اشاره کرد که سبب القای پراکسیداسیون لیپیدی غشا می‌شوند (۲۳). پراکسید شدن اسیدهای چرب غشا در غشاهای بیولوژیکی مانند غشای اسپرم منجر به از دست رفتن تدریجی تحرک و توانایی اسپرم‌ها جهت اتصال به اووسیت و آسیب به پارامترهای اسپرم می‌گردد (۲۴). از طرفی، اسپرم غنی از میتوکندری است که به عنوان یک منبع انرژی برای تحرک اسپرم عمل می‌کند. همچنین ROS سبب آسیب به غشای میتوکندری و القای استرس اکسیداتیو می‌شود. استرس اکسیداتیو باعث تخلیه ATP شده که خود موجب کاهش انرژی در دسترس و نیز منجر به فسفوریلاسیون پروتئین آکسونمال و در نهایت، کاهش تحرک اسپرم می‌گردد (۲۵). در پژوهشی که توسط Khorsandi و همکاران در سال ۲۰۱۶ انجام شد، موش‌های نژاد NMRI با کوثرستین و نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید تیمار شدند و کوثرستین توانست از طریق کاهش استرس اکسیداتیو باعث افزایش حرکات پیش‌رونده اسپرم شود (۲۶). در مطالعه حاضر قابلیت حیات اسپرم در گروه دگزامتازون در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنی‌داری یافت. کاهش قابلیت حیات اسپرم در گروه دگزامتازون را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که دگزامتازون سبب افزایش رادیکال‌های آزاد، القای استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود و استرس اکسیداتیو نیز منجر به از دست رفتن سریع ATP و در پی آن مرگ سلولی و در نتیجه کاهش قابلیت حیات اسپرم می‌گردد (۲۷). در مطالعه حاضر در گروه دگزامتازون + کوثرستین، کوثرستین توانست قابلیت حیات اسپرم را افزایش داده و به حد گروه کنترل برساند. این احتمال وجود دارد که کوثرستین با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی قوی و نیز با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی، کاهش سطح پراکسیداسیون لیپیدی و در پی آن کاهش مرگ سلولی موجب افزایش قابلیت حیات اسپرم می‌شود (۲۸). در این مطالعه، میانگین درصد اسپرم‌های با شکل طبیعی در گروه تیمار شده با دگزامتازون در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنی‌داری یافت.

در پژوهشی که توسط Adedara در سال ۲۰۱۷ انجام شد، رت‌های نر نژاد ویستار با کوثرستین و منگنز تیمار شدند که در نتیجه در گروه کوثرستین + منگنز، کوثرستین توانست منجر به کاهش اشکال غیرطبیعی اسپرم شود (۲۹). در این مطالعه، میانگین غلظت تستوسترون خون در گروه دگزامتازون، کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد. در مطالعه‌ای دیگر، دگزامتازون از طریق افزایش استرس اکسیداتیو و افزایش ترشح هورمون‌های مهارکننده ترشح گنادوتروپین (GnIH) باعث کاهش ترشح هورمون تستوسترون و مهار روند اسپرماتوژنز در بیضه پستانداران شد (۳۰). در مطالعه حاضر، غلظت تستوسترون خون در گروه دگزامتازون + کوثرستین در حد گروه کنترل بود که احتمالاً کوثرستین با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیداتی قوی خود با جلوگیری از ایجاد استرس اکسیداتیو و مرگ سلول‌های لایدیگ، از کاهش تستوسترون جلوگیری کرده است. در برخی از مطالعات؛ به‌عنوان مثال مطالعه Bharti و همکاران در سال ۲۰۱۴ که رت‌های نژاد ویستار با کوثرستین توأم با استرادیول بنزوات تیمار شدند، مشخص گردید در گروه کوثرستین + استرادیول بنزوات، کوثرستین می‌تواند اثرات مخرب استرادیول بنزوات بر سطح تستوسترون خون را کاهش دهد (۱۲). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Baltaci و همکاران در سال ۲۰۱۶ انجام شد، رت‌های نر نژاد اسپراگوداولی با کوثرستین و آرسنیک به مدت ۱۵ روز تیمار شدند که در نتیجه در گروه آرسنیک + کوثرستین، کوثرستین توانست موجب افزایش معنی‌دار سطح تستوسترون نسبت به گروه آرسنیک شود (۳۱). در مطالعه حاضر سطح مالون‌دی‌آلدئید سرم در گروه دگزامتازون نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد. در مطالعه‌ای دیگر توسط Mukherjee و همکاران در سال ۲۰۱۴، افزایش معنی‌داری در سطح MDA سرم مشاهده گردید (۵). به دلیل حضور اسیدهای چرب غیراشباع فراوان در غشای سلول‌های بیضه (۳۲) و درجه بالای متابولیسم و تکثیر سلولی، بافت بیضه جز اندام‌های حساس به استرس اکسیداتیو محسوب می‌شود که برای مقابله با اثرات رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) به سیستم دفاع آنتی‌اکسیداتی مجهز شده است (۳۳). برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتی، ازجمله کاتالاز (CAT) و سوپراکسیداز دسموتاز (SOD) برای

جاروب رادیکال‌های اکسیژن در سیستم تولیدمثلی نر اهمیت زیادی دارند (۳۲)، که در مطالعه Jin و همکاران (سال ۲۰۱۶)، کاهش این آنزیم‌ها در بیضه رت‌های تحت تیمار با دگزامتازون مشاهده شد (۳۴). تحقیقات نشان می‌دهند دگزامتازون قادر است ناهنجاری‌هایی در سیستم تناسلی به وجود آورد؛ به‌عنوان مثال در نسل اول رت‌های ماده‌ای که در طی ۲ هفته اول شیردهی با دگزامتازون تیمار شده بودند، افزایش استرس اکسیداتیو، کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتی SOD و CAT، همچنین افزایش سطح MDA بافت بیضه مشاهده گردید (۳۵)؛ بنابراین طبق مطالعات پیشین، افزایش غلظت MDA می‌تواند ناشی از افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتی در اثر تیمار با دگزامتازون باشد. از سوی دیگر، در گروه کوثرستین + دگزامتازون، کوثرستین توانست سطح مالون‌دی‌آلدئید سرم خون را کاهش داده و به حد گروه کنترل برساند که خود تأییدی بر اثرات آنتی‌اکسیداتی و ضد پراکسیداسیون لیپیدی کوثرستین است. در مطالعه‌ای که توسط Celik و همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام شد، رت‌های نر نژاد اسپراگوداولی با کوثرستین و هموسیستین به روش تزریق داخل صفاقی تیمار شدند که در گروه هموسیستین + کوثرستین، کوثرستین توانست موجب کاهش معنی‌دار سطح MDA سرم خون نسبت به گروه آرسنیک شود (۳۶). در مطالعه حاضر، ظرفیت کل آنتی‌اکسیداتی در گروه دگزامتازون در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنی‌داری یافت. Safaeian و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند تیمار رت‌های نر نژاد ویستار با دگزامتازون به مدت ۱۴ روز منجر به کاهش ظرفیت کل آنتی‌اکسیداتی که توسط FRAP اندازه‌گیری شده بود، می‌شود (۳۷). در مطالعه حاضر نیز کوثرستین توانست ظرفیت کل آنتی‌اکسیداتی در گروه دگزامتازون + کوثرستین را به حد گروه کنترل برساند که نشان‌دهنده خاصیت آنتی‌اکسیداتی و ضد آپاپتوزی کوثرستین است.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج این پژوهش، دگزامتازون می‌تواند با القای استرس اکسیداتیو در بافت بیضه موش، موجب کاهش معنی‌دار سطح

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه خانم سیده معصومه محمدی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی گرایش تکوینی از دانشگاه اراک می‌باشد. بدین‌وسیله از مساعدت‌های فراوان اعضای گروه زیست‌شناسی دانشگاه اراک که ما را در اجرای این مطالعه یاری نمودند، صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

کد ارکید نویسندگان:

Orcid Code: Malek Soleimani Mehranjani; 0000-0003-4822-2617.

Orcid Code: Seyyede Masomeh Mohammadi; 0000-0002-3854-8827.

تستوسترون خون، تعداد، شکل طبیعی، قابلیت تحرک پیش‌رونده و حیات اسپرم در گروه دگزامتازون نسبت به گروه کنترل گردد. از طرفی، کوثرستین قادر است با جلوگیری از اثرات مخرب دگزامتازون در گروه دگزامتازون + کوثرستین، تمام پارامترهای فوق را تقریباً به حد گروه کنترل برساند. در این پژوهش اثبات گردید کوثرستین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی، اثر نیرومندی در جلوگیری از آسیب‌های استرس اکسیداتیو حاصل از دگزامتازون دارد؛ از این‌رو می‌توان از کوثرستین برای مهار استرس اکسیداتیو ناشی از درمان با دگزامتازون استفاده کرد.

References:

1. Mansour R, Aboulghar M, Serous G. Intracytoplasmic sperm injection using microscopically retrieved epididymal and testicular sperm. *Ferti Steril* 1996;65(3):566-72. PubMed
2. Sharma RK. Physiology of male gametogenesis. *Clin Reprod Med Surg* 2007;4:73-83. Link
3. Hosseini SE, Moshveghi M. The Effects of Prenatal Dexamethasone on development and function of testis in offspring of rats of first lineage. *Med J Tabriz Uni Med Sci Health Serv* 2016;38(1):26-31. [Full Text in Persian] Link
4. Guettaf HS, Bekkouche FH. Dexamethasone: Impact on Testicular Activity. *Int J Biol, Biomol, Agric* 2014;8(7):759-61. Link
5. Mukherjee A, Halder CH, Vishwas D. Melatonin prevents dexamethasone induced testicular oxidative stress and germ cell apoptosis in golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *Andrologia* 2015;47(8):920-31. Pubmed
6. Hashemitabar M, Orazizzadeh M, Khorsandi LS, Albughobeish N. Dexamethasone effects on Bax expression in the mouse testicular germ cells. *Folia Histochem Cytobiol* 2009;47(2):237-41. PubMed
7. Hanafy AM, Khalil HA. Influence of chronic dexamethasone administration on reproductive parameters and semen traits in male of Japanese Quail. *Asian J Poult Sci* 2015;9(4):223-32. Link
8. Khorsandi L, Mirhoseini M, Mohamadpour M, Orazizadeh M, Khaghani S. Effect of curcumin on dexamethasone-induced testicular toxicity in mice. *Pharm Biol* 2013;51(2):206-12. PubMed
9. Jaisinghani RN. Antibacterial properties of quercetin. *Microbiol Res* 2017;8(2):68-77. Link
10. Vinayagam R, Xu B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: A cellular mechanism review. *Nutr Metab (Lond)* 2015;12:60. PubMed
11. Li X, Wang R, Zhou N, Wang X, Liu Q, Bai Y, et al. Quercetin improves insulin resistance and hepatic lipid accumulation in vitro in aNSFLD cell model. *Biomed Rep* 2013;1(1):71-6. PubMed
12. Bharti S, Misro MM, Rai U. Quercetin supplementation restores testicular function and augments germ cell survival in the estrogenized rats. *Mol Cell Endocrinol* 2014;383(1-2):10-20. PubMed

13. Choudhary R, Chawala VK, Soni ND, Kumar J, Vyas RK. Oxidative stress and role of antioxidants in male Infertility. *Pak J Physiol* 2010;6(2):54-9. Link
14. Aldemir M, Okulu E, Kosemehmetoglu K, et al. Evaluation of the protective effect of quercetin against cisplatin-induced renal and testis tissue damage and sperm parameters in rats. *Andrology* 2014;46(10):1089-97. PubMed
15. Momeni HR, Daneshpajoh F. Protective effect of vitamin E on sperm Parameters in adult rat treated with para-nonylphenol. *J Cell Tissue (JCT)* 2012;2(4):415-24. [Full Text in Persian]. Link
16. Aly HA, Domènech O, Banjar ZM. Effect of nonylphenol on male reproduction: Analysis of rat epididymal biochemical markers and antioxidant defense enzymes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;261:134-41. PubMed
17. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid Peroxidation products; malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186:407-21. Link
18. Niknafs B, Mirzaei N, Anarcoolli IJ. Protective effects of melatonin on Dexamethasone toxicity in seminiferous tubules in comparison with testosterone treatment. *Jokull* 2015;65. Link
19. Junqueira LS, Carnerio J. Basic histology: Text & Atlas. 11th ed. McGraw-Hill Medical; 2005. Link
20. Badrinarayanan R, Rengarjan S, Nthya PBalasubramanian K. Corticosterone impairs the mRNA expression and activity of 3 β and 17 β hydroxysteroid dehydrogenases in adult rat Leydig cells. *Biochem Cell Biol* 2006;84(5):745-54. PubMed
21. Jie X, Yang W, Jie Y, Hashim JH, Liu XY, Fan QY, Yan L. Toxic effect of gestational exposure to nonylphenol on F1 male rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2010;89(5):418-28. PubMed
22. Omair MA, Sedky A, Ali A, Elsayy H. Ameliorative potentials of quercetin against lead-induced hematological and testicular alterations in albino rats. *Chin J Physiol* 2017;60(1):54-61. PubMed
23. Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertility* 1979;31(5):531-7. PubMed
24. Allamaneni SS, Agarwal A, Nallella KP, Thomas Jr AJ, Sikka SC. Characterization of oxidative stress status by evaluation of reactive oxygen species levels in whole semen and isolated spermatozoa. *Fertil Steril* 2005;83(3):800-3. PubMed
25. Badade Z, Samant P. Role of oxidative stress in male infertility. *J Biomed Sci Res* 2011;3(2):385-91. Link
26. Khorsandi L, Orazizadeh M, Gharibvand NM, Hemadi M, Mansouri1E. Beneficial effects of quercetin on titanium dioxide nanoparticles induced spermatogenesis defects in mice. *Environ Sci Pollut* 2017;24(6):5595-606. PubMed
27. Silva EJR, Vendramini V, Restelli A, Bertolla RP, Kempinas WG. Impact of adrenalectomy and dexamethasone treatment on testicular morphology and sperm parameters in rats: Insights into the adrenal control of male reproduction. *Andrology* 2014;2(6):835-46. PubMed
28. Taepongsorat L, Tangpraputgul P, Kitana N, Malaivijitnond S. Stimulating effect of quercetin on sperm quality and reproductive organ in adult male rats. *Asian J Androl* 2008;10(2):249-58. PubMed
29. Adedara IA, Subair IT, Ego VC, Oyediran O, Farombi EO. Chemoprotective role of quercetin in manganese-induced toxicity along the brain-pituitary-testicular axis in rats. *Chem Biol Interact* 2017;263:88-98. PubMed
30. Ubuka T, Son YL, Tobari Y, Narihiro M, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, et al. Central and direct regulation of testicular activity by gonadotropin-inhibiting-hormone and its receptor. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014;5:9-16. PubMed
31. Baltaci1 BB, Uygur R, CaglarV, Aktas C, Aydin M, Ozen OA. Protective effects of quercetin against arsenic-induced testicular damage in rats. *Andrologia* 2016;48(10):1202-13. PubMed

32. Wu HJ, Liu C, Duan WX, Xu SC, He MD, Chen CH, et al. Melatonin ameliorates bisphenol A-INDUCED dna Damage in the germ cells of adult male rats. *Mutat Res* 2013;752(1-2):57-67. PubMed
33. Elshaari FA, Fatum AE, Sheriff DSS. Permatozoa-an unique representation of Oxygen-Anioxidant paradox. *Acta Medica Medianae* 2010;49(1):48-53. Link
34. Jin YI, Ruocen ZHU, Jianping WU, Jing WU, Wei XIA, Lijuan ZHU, et al. In vivo protective effect of betulinic acid on dexamethasone induced thymocyte apoptosis by reducing oxidative stress. *Pharmacol Rep* 2016;68(1):95-100. PubMed
35. Jeje SO, Mudathir FK Raji Y. Experimental maternal treatment with Dexamethasone during lactation induces neonatal testicular and Epididymal oxidative stress; Implications for early postnatal exposure. *Phthophysiology* 2017;24(4):261-5. PubMed
36. Celik N, Vurmaz A, Kahraman A. Protective effect of quercetin on Homocysteine-induced oxidative stress. *Nutrition* 2017;33:291-6. PubMed
37. Safaeian L, Ghannadi A, Javanmard SH, Vahidian MH. The effect of hydroalcoholic extract of *Ferula foetida* stems on blood pressure and oxidative stress in dexamethasone-induced hypertensive rats. *Res Pharm Sci* 2015;10(4):326-34. PubMed