

## **The stereological study of the effect of vitamin E on the structure of ovary and its number of follicles during ovary development in rats treated with sodium arsenite**

Shariatzadeh SMA(PhD)<sup>1</sup>, Soleimanimehranjani M(PhD)<sup>1</sup>, Hamta A(PhD)<sup>2</sup>, Ghandizadehdezfuli M(M.Sc)<sup>1\*</sup>

1- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Arak University, Arak, Iran

2- Department of Biology, Arak University, Arak, Iran

Received: 10 March 2011, Accepted: 26 Jul 2011

### **Abstract**

**Background:** Sodium arsenite has adverse effects on the reproductive system and vitamin E is a strong antioxidant and reproductive factor in the reproductive system. The aim of this study was to investigate the effect of vitamin E on the structure and the number of ovarian follicles during its development in rats treated with sodium arsenite.

**Materials and Methods:** Pregnant Wister rats (n=4) were divided into 4 equal groups, including control, vitamin E (100mg/kg/day), sodium arsenite (8mg/kg/day), and sodium arsenite+vitamin E. Oral treatment of the pregnant rats started from the 7<sup>th</sup> day of pregnancy till the end of the weaning and continued till the age of 120 days. After the treatment period, the right ovary was removed and fixed, and then the mean number of ovarian follicles and atretic follicles, mean thickness of zona pellucida, and volume of oocytes and its nuclei in different types of follicle were determined. Data were analysed using one-way ANOVA and the mean difference was considered significant at P<0.05.

**Results:** In the vitamin E+sodium arsenite group, significant increase(P<0.05) in the total number of follicles, mean number of primordial, primary, secondary, antral, and graafian follicles, significant reduction (P<0.05) in atretic follicles, and significant increase(P<0.05) in the thickness of zona pellucida in secondary and antral follicles as well as oocyte volume in parimordial and primary follicles and its nuclei in primary, secondary, antral, and graffian follicles were observed in comparison with the other groups. Vitamin E in the sodium arsenite+vitamin E group increased the number of different types of follicles and the thickness of the zona pllucida (P<0.05), decreased the number of atretic follicles, and increased the volume of oocyte and its nuclei to the level of the control group.

**Conclusion:** Vitamin E can be administered as a supplement to compensate for the adverse effects of sodium arsenite.

**Keywords:** Follicle, Ovary, Rat, Sodium arsenite, Stereology, Vitamin E

\*Corresponding author:

Address: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Arak University, Arak, Iran

Email: Maryam.Ghandizadeh81@gmail.com

## مطالعه اثر ویتامین E بر ساختمان و تعداد فولیکول‌های تخمدان در طی تکامل تخمدان در رت‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت (بررسی استریولوژیک)

سید محمد علی شریعت زاده<sup>1</sup>، ملک سلیمانی مهرنجانی<sup>2</sup>، احمد همتا<sup>3</sup>، مریم قندی زاده دزفولی<sup>4\*</sup>

1- استاد، دکترای تخصصی بافت شناسی و جنین شناسی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

2- دانشیار، دکترای تخصصی بافت شناسی و جنین شناسی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

3- استادیار، دکترای تخصصی زیست شناسی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

4- کارشناس ارشد زیست شناسی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: 89/12/20 تاریخ پذیرش: 90/5/5

### چکیده

**زمینه و هدف:** سدیم آرسنیت بر روی سیستم تولید مثلی اثرات سوء داشته و ویتامین E آنتی آکسیدانی قوی و فاکتور مهم تولید مثلی است. هدف از این مطالعه بررسی اثر ویتامین E بر ساختمان و تعداد فولیکول‌های تخمدان در طی تکامل آن در رت‌های تیمار شده با سدیم آرسنیت بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، رت‌های باردار نژاد ویستار به 4 گروه 6 تایی کنترل، ویتامین E، سدیم آرسنیت و سدیم آرسنیت+ویتامین E تقسیم شدند. تیمار مادران با گاوژ از روز هفتم حاملگی تا پایان دوره شیرخوارگی انجام سپس تا 120 روزگی بر روی نوزادان ادامه یافت. در پایان، تخمدان چپ خارج، فیکس و تعداد انواع فولیکول‌های تخمدان، فولیکول‌های آترزی، ضخامت منطقه شفاف، حجم اووسیت و هسته آن در انواع فولیکول‌ها در برش بافتی تخمین زده شد. در پایان داده‌ها با نرم افزار SPSS و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** سدیم آرسنیت باعث کاهش ( $p < 0/05$ ) تعداد کل فولیکول‌های، بدوی، ثانویه، آنترال و گراف و افزایش ( $p < 0/05$ ) فولیکول‌های آترزی و کاهش ( $p < 0/05$ ) ضخامت منطقه شفاف در فولیکول‌های ثانویه و آنترال و همچنین کاهش ( $p < 0/05$ ) میانگین حجم اووسیت در انواع فولیکول‌های بدوی و اولیه و میانگین حجم هسته اووسیت در انواع فولیکول‌های اولیه، ثانویه، آنترال و گراف در گروه سدیم آرسنیت نسبت به سایر گروه‌ها شد. ویتامین E در گروه سدیم آرسنیت+ویتامین E موجب افزایش ( $p < 0/05$ ) تعداد انواع فولیکول‌ها و ضخامت منطقه شفاف و همچنین کاهش تعداد فولیکول‌های آترتیک و افزایش حجم اووسیت و هسته آن در حد گروه کنترل شد.

**نتیجه گیری:** می‌توان ویتامین E را به عنوان یک مکمل در جبران اثرات سوء ناشی از سدیم آرسنیت استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** استریولوژی، تخمدان، رت، سدیم آرسنیت، فولیکول، ویتامین E

\* نویسنده مسئول: اراک، دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

## مقدمه

افزایش جمعیت و تقاضای روز افزون بشر برای غذا و دیگر امکانات زندگی، باعث شده است که انسان محیط زیست را جهت تامین نیازهای خود دستخوش تغییراتی نماید. کارخانه‌ها، راه‌ها، استفاده بیشتر از منابع آب‌های سطحی و زیر زمینی، استخراج معادن، باعث شده محیط زیست به انواع فلزات سمی و سایر سموم آلوده شود (1). آرسنیک، از آلاینده‌های زیست محیطی محسوب می‌شود. به دلیل کاربرد آن در صنعت، مقدار آن در شهرهای صنعتی بیش از سایر مناطق است و اثرات زیانبار آن بر روی گیاهان، جانوران و انسان اثبات شده است (2). این آلاینده از طرق مختلف دهانی یا تنفسی می‌تواند وارد بدن شود (3). از طریق دهانی توسط مصرف آب آلوده، غذا و داروها می‌باشد و تنفسی از طریق ذوب سنگ معدن، ساخت و تولید شیشه و نیمه رساناها و تولید برق به وسیله سوختن زغال سنگ آلوده به آرسنیک رخ می‌دهد (4). ده‌ها میلیون انسان در کشورهای در حال توسعه در معرض سطوح بالای آرسنیک در آب آشامیدنی شان هستند و این آلودگی جریان وسیعی از مسمومیت‌های شیمیایی را در جهان ایجاد کرده است (1). در کشور ما، در مناطقی از خراسان و کردستان، آلودگی منابع آب با آرسنیک مشاهده شده است (5). آرسنیک و ترکیبات آن سمی هستند (6). در معرض شدید آرسنیک قرار گرفتن، باعث اثرات کارسینوژنیک هم در انسان و حیوان می‌شود (1). به عنوان مثال، باعث ایجاد تومور در انواع بافت‌ها مانند ریه، پوست و مثانه می‌شود. مطالعات دیگر نشان می‌دهد که کلیه، کبد، رحم و پروستات ممکن است مکان‌های هدف آرسنیک باشند و آرسنیک بر روی این اندام‌ها خاصیت کارسینوژنیک داشته باشد. در سال‌های اخیر مشخص شده که آرسینک باعث مهار عملکرد استروئوژنیک (Steroidogenic) تخمدانی و ترشح گنادوتروپین‌ها می‌شود (7) هم‌چنین مشخص شده که سدیم آرسینک در دوز موجود در آب خوراکی باعث اختلال در عملکرد تخمدان می‌شود (8). آرسینک تولید رادیکال‌های آزاد را افزایش می‌دهد (3). در این مطالعه به نقش ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی در از بین

بردن اثرات مضر آرسینک بر روی تخمدان توجه شده است. آنتی اکسیدان‌ها با خنثی سازی رادیکال‌های آزاد فرآیند اکسیداسیون را متوقف می‌کنند. ویتامین E عنوانی است که به گروهی از توکوفرول‌ها و توکوترینول‌ها داده می‌شود که  $\alpha$ -tocopherol- بیشترین فعالیت زیستی را در بین آنها دارد (9).

## مواد و روش‌ها

برای انجام این مطالعه 24 سررت ماده بالغ و 12 سررت نر بالغ از نژاد ویستار (Wistar) از انیستیتو پاستور ایران خریداری شد و در شرایط استاندارد (دمای  $21 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و نور محیطی با شرایط 12 ساعت تاریکی و 12 ساعت روشنایی) جهت سازگاری با محیط، رت‌ها به مدت 2 هفته با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. سپس بعد از جفت‌گیری، با استفاده از تست واژن بارداری بودن رت‌ها تعیین گردید، سپس رت‌های بارداری به 4 گروه کنترل (تیمار با روغن ذرت)، تیمار با ویتامین E (100 میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز) (تهیه شده از شرکت سیگما) (10) تیمار با سدیم آرسنیت (8 میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز) (تهیه شده از شرکت مرک آلمان) (11) تیمار با ویتامین E + سدیم آرسنیت تقسیم شدند. تیمار حیوانات از روز هفتم حاملگی آغاز گردید که تا به دنیا آمدن نوزادان (Neonatal) و از شیر گرفتن (Weaning) آنها بر روی مادر ادامه پیدا کرد. بعد از شیرگیری، نوزادان ماده (از هر گروه 6 سر) جهت ادامه تیمار طبق گروه‌بندی ذکر شده تحت تیمار قرار گرفتند. تیمار به صورت دهانی توسط گاوآژ و با فاصله زمانی 24 ساعت به مدت 120 روز انجام گرفت (12). در پایان دوره تیمار ابتدا رت‌ها توسط دی اتیل اتر بیهوش و بعد از تشریح تخمدان چپ آنها خارج و پس از وزن کردن در فیکساتیو NBF (Buffer Formaldehyde) قرار داده شد. بعد از گذشت یک هفته از فیکس شدن، مراحل پاساژ بافتی و تهیه بلوک پارافینی در قالب‌های استوانه‌ای شکل، به روش Isector برش IUR استفاده شد. برای این منظور ابتدا قالب استوانه‌ای شکل به صورت تصادفی روی ساعت فی ( $\phi$ )، که به 9 قسمت مساوی تقسیم شده بود قرار گرفت، سپس با انتخاب یک عدد تصادفی بین

برای به دست آوردن بزرگنمایی واقعی، تصویر لام گراتیکول که به 10 بخش 0/05 میلی متری تقسیم شده بود را با کمک میکروسکوپ Olympus (BX41TE) و ob100 توسط نرم افزار Olisya بر روی مانیتور کامپیوتر انداخته، سپس فاصله یکی از قسمت‌ها به وسیله خط‌کش اندازه‌گیری گردید که برابر با 74 میلی‌متر شد، سپس بزرگنمایی محاسبه شد:

$$M=74 \div 0/05 =1480$$

به دلیل این که فریم‌ها در واحد سطح بیان می‌شوند، بزرگنمایی باید در خودش ضرب شود.

برای محاسبه حجم اووسیت از روش Nucleator استفاده شد. در این روش از برش‌های 20 میکرونی استفاده شد که به طور تصادفی 12 برش انتخاب و سپس با فولیکول‌های هر برش با استفاده از فریم مخصوص شمارش بدون جهت‌گیری، از میدان دید انتخاب شده توسط میکروسکوپ Olympus (BX14TE) که به دورین عکاسی (DP12 (Olympus)) ساخت ژاپن، و نرم افزار Olysa (با 100ob) مجهز بود، عکس گرفته شد. برای محاسبه کردن حجم اووسیت، از نرم افزار موتیک Motic (images 2000) استفاده شد، به این صورت که از مرکز هستک تا غشای اووسیت اندازه‌گیری گشته و برای حساب کردن حجم هسته، از مرکز هستک تا غشای هسته اندازه‌گیری شد. اگر هستک مشخص نبود، مرکز هسته به صورت قراردادی، در نظر گرفته می‌شود. اندازه‌گیری‌ها در دو جهت مختلف انجام شد. حجم به وسیله رابطه زیر محاسبه شد (13).

$L_n$ : اندازه مرکز هستک تا غشاء اووسیت یا مرکز هستک تا غشاء هسته

$$V_n = \frac{4}{3} \pi \times \overline{L_n^3}$$

برای محاسبه ضخامت منطقه شفاف، از برش‌های 5 میکرونی استفاده می‌شود. به این صورت که به طور میانگین 12 برش به طور تصادفی انتخاب شده و از انواع فولیکول‌های انتخاب شده در فیلدهای مختلف با استفاده از میکروسکوپ مجهز به دورین عکس‌برداری Olympus (P12 ساخت ژاپن و توسط نرم افزار Olysa با 100 ob

صفر تا 9 در امتداد عدد انتخاب شده برش داده شد. سپس بر روی ساعت تا (θ) طوری قرار گرفت که سطح برش خورده در طول محور 0-0 ساعت تا قرار گیرد. پس از آن یک عدد تصادفی دیگر انتخاب و در امتداد آن برش داده شد (13). پس از جهت برش دوم با استفاده از میکروتوم برش‌های 5 میکرونی و 20 میکرونی گرفته و به روش هماتوکسیلین-اتوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. برای بررسی نمونه‌های تهیه شده از روش‌های استریولوژی استفاده شد. به این منظور، برای محاسبه تعداد انواع فولیکول‌ها در تخمدان از روش Optical dissector استفاده کردیم. همچنین از دستگاه میکروکیتور (HEIDEW MAIN ND221B) و از فریم مخصوص شمارش استفاده گردید. برای محاسبه تعداد انواع فولیکول‌ها به دلیل اندازه‌های متفاوت آنها، از برش‌های 20 میکرونی استفاده شد، به این ترتیب که به طور تصادفی 12 برش انتخاب شد. سپس تمام میدان دید هر برش با استفاده از میکروسکوپ Olympus (BX41TE) و با 100 obj بررسی شد. طبق روش شمارش بر روی فریم مخصوص شمارش، فولیکول‌هایی انتخاب می‌شوند که هسته آنها در داخل فریم شمارش و یا روی خطوط قابل پذیرش باشند، آنهایی که با خطوط ممنوعه تماس دارند، مورد قبول نیستند و شمارش نمی‌شوند. سپس دانسیته عددی انواع فولیکول‌ها بر طبق رابطه زیر محاسبه شد:

$$\frac{\sum_{i=1}^n Q}{h \times \sum_{n=1}^n P \times \frac{a}{f}} = Nv$$

مجموع نقاط برخورد کرده با فیلدهای انتخابی  $= \sum_{i=1}^n P$   
مجموع تعداد انواع فولیکول‌های شمرده شده  $= \sum_{i=1}^n Q$   
a/f = سطح فریم در مقیاس واقعی بافت

h = ارتفاعی از برش که در آن شمارش صورت می‌گیرد.  
سپس دانسیته تعداد در حجم تخمدان ضرب شد تا نسبت مطلق تعداد فولیکول‌ها به دست آید.

$$N_{(toti)} = Nv \times V_{(reff)}$$

داده‌های حاصل توسط نرم افزار SPSS نسخه 11 و روش آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) با شرط نرمال بودن و تست آماری توکی (Tukey) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح  $p < 0/05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

#### یافته ها

بررسی میکروسکوپی مقاطع تهیه شده از بافت تخمدان در گروه‌های مختلف (شکل 1)، نتایج زیر را نشان داد. ساختمان بافت تخمدان در گروه‌های کنترل، ویتامین E و سدیم آرسنیت + ویتامین E طبیعی به نظر می‌رسد (شکل 1-a) اما در گروه تیمار شده با سدیم آرسنیت، جسم زرد دارای تعداد زیادی واکوئل می‌باشد (شکل 1-b). هم‌چنین در این گروه، جسم زرد دچار احتقان و پرخونی عروق (vascular congection) شده (شکل 1-c) در حالی که در گروه سدیم آرسنیت + ویتامین E، بافت تخمدان نسبت به گروه کنترل تغییری نشان نداد (شکل 1-d). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در گروه سدیم آرسنیت + ویتامین E، ویتامین E قادر به جلوگیری از ایجاد تغییرات هیستوپاتولوژیک در بافت تخمدان می‌باشد.

عکس‌برداری انجام گردید. برای اندازه‌گیری ضخامت، پروب مخصوص اندازه‌گیری ضخامت بدون جهت‌گیری بر روی تصویر انداخته شد و از محل تقاطع خطوط گراید با غشاء داخلی منطقه شفاف خطی عمود مماس با غشای داخلی در نظر گرفته و طول آن توسط نرم افزار موتیک اندازه‌گیری شد که این اندازه‌ها با عنوان OI (Orthogonal Intercept) نشان داده شد و در فرمول هارمونیک به شرح زیر قرار گرفت. برای تخمدان هر رت به طور میانگین 100 تا 200 برخورد اندازه‌گیری شد. سپس از فرمول زیر میانگین ضخامت منطقه شفاف به دست آمد (14).

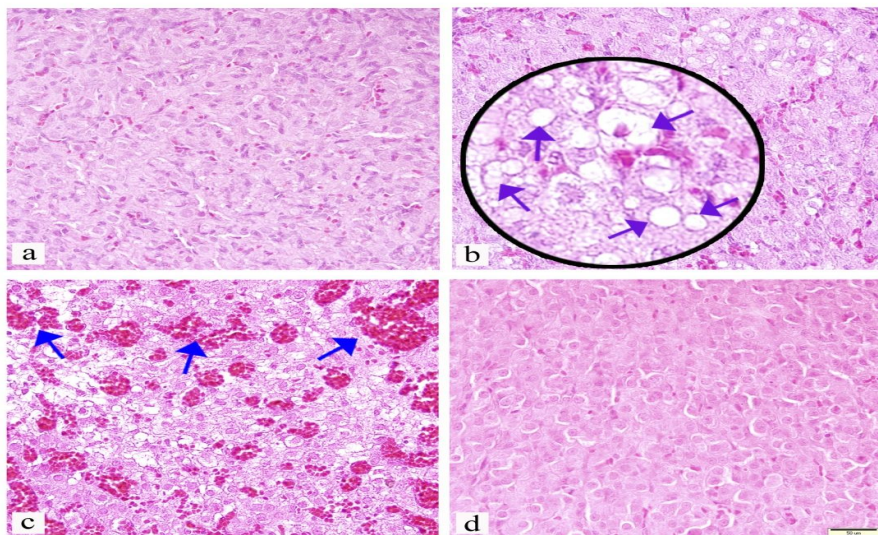
$8/3 = \text{ضخامت منطقه شفاف} \times \pi / \text{تعداد}$

اندازه‌گیری‌ها  $(\frac{1}{oi_1} + \frac{1}{oi_2} + \frac{1}{oi_3} + \frac{1}{oi_4} + \dots)$

تعداد برخورد خطوط پروب با منطقه شفاف = تعداد اندازه‌گیری‌ها

$(\frac{1}{oi_1} + \frac{1}{oi_2} + \frac{1}{oi_3} + \frac{1}{oi_4} + \dots) = \text{مجموع معکوس}$

اندازه‌های خطوط عمود بر مماس سطح خارجی منطقه شفاف



شکل 1- تصویر میکروسکوپی از بافت تخمدان رت های تیمار شده با سدیم آرسنیت (8 mg/kgbw) و ویتامین E (100 میلی گرم بر کیلوگرم در روز) (برش های 5 میکرونی، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، بزرگنمایی  $\times 40$ ) نشان دهنده:

a- ساختمان طبیعی جسم زرد در رت‌های گروه کنترل

b- وجود واکوئل های فراوان در جسم زرد در رت های تیمار شده با سدیم آرسنیت (که با  $\nearrow$  مشخص شده است).

c- وجود احتقان و پر خونی عروق در جسم زرد گروه تیمار شده با سدیم آرسنیت (که با  $\nearrow$  مشخص شده است).

d- جسم زرد در گروه سدیم آرسنیت + ویتامین E که دارای نمای طبیعی شده است.

است ( $p > 0/05$ ). هم چنین در گروه ویتامین E نسبت به گروه های کنترل و سدیم آرسنیت + ویتامین E افزایش معنی دار ( $p < 0/034$ ) مشاهده شد، در حالی که گروه سدیم آرسنیت + ویتامین E نسبت به گروه کنترل تغییر معنی داری نشان نداد ( $p > 0/05$ ).

از مقایسه میانگین تعداد فولیکول های گراف آف مشخص می شود که تعداد این فولیکول ها در گروه سدیم آرسنیت نسبت به گروه های دیگر کاهش معنی دار ( $p < 0/003$ ) نشان داده، هم چنین در گروه ویتامین E نسبت به سایر گروه ها افزایش معنی دار مشاهده می شود ( $p < 0/001$ ). ولی گروه سدیم آرسنیت + ویتامین E نسبت به گروه کنترل تغییر معنی داری نشان نداد ( $p > 0/05$ ).

مقایسه میانگین تعداد فولیکول های آترزی در گروه های متفاوت، نشان می دهد که تعداد این فولیکول ها در گروه سدیم آرسنیت نسبت به سایر گروه ها افزایش معنی دار نشان داده است ( $p < 0/001$ ). در حالی که گروه ویتامین E نسبت به گروه کنترل و گروه سدیم آرسنیت + ویتامین E تغییر معنی داری نشان نداد ( $p > 0/05$ ) و گروه سدیم آرسنیت + ویتامین E نیز نسبت به گروه کنترل تغییر معنی داری نشان نداد ( $p > 0/05$ ).

جدول 1. مقایسه میانگین تعداد کل فولیکول ها و تعداد فولیکول های بدوی، اولیه، ثانویه، انترال، گراف و آترزی در گروه های مختلف پس از 120 روز تیمار با سدیم آرسنیت (8 میلی گرم بر کیلوگرم در روز) و ویتامین E (100 میلی گرم بر کیلوگرم در روز) از زمان حاملگی تا بلوغ جنسی

گروه ها	بدوی	اولیه	ثانویه	انترال	گراف	آترزی	تعداد کل
کنترل	2251 <sup>a</sup> ±129/69	1385 <sup>a</sup> ±122/06	898 <sup>a</sup> ±153/69	595 <sup>a</sup> ±156/96	162 <sup>a</sup> ±30/85	48 <sup>a</sup> ±7/05	5292 <sup>a</sup> ±389/83
سدیم آرسنیت	1550 <sup>b</sup> ±126/91	1001 <sup>ac</sup> ±102/53	629 <sup>b</sup> ±81/56	310 <sup>b</sup> ±86/80	78 <sup>b</sup> ±25/17	71 <sup>b</sup> ±11/44	3553 <sup>b</sup> ±307/78
سدیم آرسنیت + ویتامین E	2544 <sup>a</sup> ±322/08	1598 <sup>ad</sup> ±260/66	950 <sup>a</sup> ±181/18	521 <sup>ab</sup> ±148/71	149 <sup>a</sup> ±35/30	47 <sup>a</sup> ±5/75	5763 <sup>a</sup> ±799/33
ویتامین E	3807 <sup>c</sup> ±444/77	2265 <sup>b</sup> ±379/70	1218 <sup>c</sup> ±198/78	823 <sup>c</sup> ±124/16	252 <sup>c</sup> ±25/93	40 <sup>a</sup> ±3/65	8357 <sup>c</sup> ±704/19

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار می باشند. میانگین های با کد حرف های متفاوت، دارای تفاوت معنی دار می باشند (One way ( $p < 0/05$ ))

ANOVA, Tukey test

ثانویه، گروه سدیم آرسنیت نسبت به گروه سدیم آرسنیت+ویتامین E کاهش معنی دار نشان داد ( $p<0/014$ ) و گروه ویتامین E نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی داری نشان داد ( $p<0/001$ ) و گروه‌های سدیم آرسنیت و سدیم آرسنیت + ویتامین E نسبت به گروه کنترل تغییر معنی داری نشان ندادند ( $p>0/05$ ).

از مقایسه اندازه میانگین حجم اووسیت ( $\mu\text{m}^3$ ) در فولیکول‌های آنترال فقط در گروه ویتامین E نسبت به گروه سدیم آرسنیت افزایش معنی دار مشاهده شد ( $p<0/001$ )، در بقیه گروه‌ها تغییر معنی داری مشاهده نشد ( $p>0/05$ ). هم‌چنین در بین فولیکول‌های گراآف فقط در گروه ویتامین E نسبت به گروه سدیم آرسنیت افزایش معنی دار مشاهده شد ( $p<0/011$ )، در بقیه گروه‌ها تغییر معنی داری مشاهده نشد ( $p>0/05$ ) (جدول 2).

از مقایسه میانگین حجم اووسیت ( $\mu\text{m}^3$ ) در فولیکول‌های بدوی در گروه سدیم آرسنیت نسبت به گروه‌های دیگر ( $p<0/001$ ) کاهش معنی داری مشاهده شد و در گروه ویتامین E نسبت به گروه سدیم آرسنیت + ویتامین E افزایش معنی داری دیده شد ( $p<0/013$ ). در حالی که گروه سدیم آرسنیت+ویتامین E و ویتامین E نسبت به گروه کنترل تغییر معنی داری نشان ندادند ( $p>0/05$ ). از مقایسه بین فولیکول‌های اولیه در گروه سدیم آرسنیت نسبت به گروه‌های دیگر ( $p<0/004$ ) کاهش معنی داری مشاهده شد و در گروه ویتامین E نسبت به گروه سدیم آرسنیت+ویتامین E افزایش معنی داری ملاحظه گردید ( $p<0/012$ ). در حالی که در گروه سدیم آرسنیت+ویتامین E و ویتامین E نسبت به گروه کنترل تغییر معنی داری مشاهده نمی‌شود ( $p>0/05$ ). در بین فولیکول‌های

جدول 2. مقایسه میانگین حجم اووسیت در انواع فولیکول‌ها ( $\mu\text{m}^3$ ) در گروه‌های مختلف پس از 120 روز تیمار با سدیم آرسنیت (8 میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز) و ویتامین E (100 میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز) از زمان حاملگی تا بلوغ جنسی

گروه ها	بدوی	اولیه	ثانویه	آنترال	گراآف
کنترل	1547/5 <sup>a</sup> ±131/3	3595/0 <sup>a</sup> ±284/7	49748/1 <sup>a</sup> ± 4697/8	188370/2 <sup>a</sup> ±12654/5	205288/7 <sup>a</sup> ±16957/8
سدیم آرسنیت	1105/4 <sup>b</sup> ±41/7	2759/8 <sup>b</sup> ±182/0	37725/7 <sup>ac</sup> ±4086/8	159442/6 <sup>ab</sup> ±21537/7	191858/8 <sup>ab</sup> ±20403/3
سدیم آرسنیت + ویتامین E	1493/8 <sup>ad</sup> ±207/9	3351/2 <sup>ad</sup> ±247/5	55313/6 <sup>ad</sup> ± 10246/0	183491/8 <sup>a</sup> ±22940/0	213391/1 <sup>a</sup> ±35186/8
ویتامین E	1779/5 <sup>ac</sup> ±143/2	3866/5 <sup>ac</sup> ±301/6	82388/2 <sup>b</sup> ±13238/7	216686/4 <sup>ac</sup> ± 23803/8	240433/4 <sup>ac</sup> ± 18375/8

مقادیر به صورت میانگین±انحراف معیار می‌باشند. میانگین های با کد حرفهای متفاوت، دارای تفاوت معنی دار می‌باشند (One way ANOVA, Tukey test ( $p<0/05$ ))

معنی داری ( $p<0/014$ ) نشان داد و در گروه ویتامین E هم نسبت به گروه‌های دیگر افزایش معنی داری ( $p<0/007$ ) ملاحظه گردید. گروه کنترل و گروه سدیم آرسنیت + ویتامین E نسبت به هم تغییر معنی داری نشان ندادند ( $p>0/05$ ).

در فولیکول‌های آنترال، میانگین حجم هسته اووسیت ( $\mu\text{m}^3$ ) در گروه سدیم آرسنیت نسبت به گروه کنترل و ویتامین E کاهش معنی دار ( $p<0/008$ ) نشان داد در حالی که نسبت به گروه سدیم آرسنیت + ویتامین E تغییر معنی داری مشاهده نگردید ( $p>0/05$ ). در گروه ویتامین E نسبت به گروه‌های دیگر افزایش معنی داری ( $p<0/003$ )

در فولیکول‌های اولیه، از مقایسه میانگین حجم هسته اووسیت ( $\mu\text{m}^3$ ) در گروه سدیم آرسنیت نسبت به گروه کنترل و گروه ویتامین E کاهش معنی داری ( $p<0/003$ ) مشاهده شد در حالی که نسبت به گروه سدیم آرسنیت + ویتامین E تغییر معنی داری مشاهده نشد ( $p>0/05$ ) و در گروه ویتامین E هم نسبت به دیگر گروه‌ها افزایش معنی داری دیده شد ( $p<0/001$ ). هم‌چنین در گروه کنترل نسبت به گروه سدیم آرسنیت+ویتامین E تغییر معنی داری مشاهده نشد ( $p>0/05$ ).

میانگین حجم هسته اووسیت ( $\mu\text{m}^3$ ) فولیکول‌های ثانویه در گروه سدیم آرسنیت نسبت به بقیه گروه‌ها کاهش

هم چنین از مقایسه گروه ویتامین E با سایر گروه‌ها افزایش معنی داری ( $p < 0/002$ ) مشاهده شد و گروه سدیم آرسنیت + ویتامین E نسبت به گروه کنترل تغییر معنی داری نشان نداد ( $p > 0/05$ ) (جدول 3).

دیده شد در حالی که گروه سدیم آرسنیت + ویتامین E نسبت به کنترل تغییر معنی داری نشان نداد ( $p > 0/05$ ). از مقایسه میانگین حجم هسته اووسیت ( $\mu\text{m}^3$ ) در فولیکول‌های گراف، در گروه سدیم آرسنیت نسبت به سایر گروه‌ها تفاوت معنی داری ( $p < 0/002$ ) مشاهده شد و

جدول 3. مقایسه میانگین حجم هسته اووسیت در انواع فولیکول‌ها ( $\mu\text{m}^3$ ) در گروه‌های مختلف پس از 120 روز تیمار با سدیم آرسنیت (8 میلی گرم بر کیلوگرم در روز) و ویتامین E (100 میلی گرم بر کیلوگرم در روز) از زمان حاملگی تا بلوغ جنسی

گروهها	اولیه	ثانویه	آنترال	گراف
کنترل	476/20 <sup>a</sup> ± 45/9	2531/28 <sup>a</sup> ± 322/94	3067/95 <sup>a</sup> ± 115/43	3725/16 <sup>a</sup> ± 293/54
سدیم آرسنیت	310/87 <sup>b</sup> ± 19/53	2089/35 <sup>b</sup> ± 146/01	2438/08 <sup>b</sup> ± 83/80	2613/90 <sup>b</sup> ± 174/62
سدیم آرسنیت + ویتامین E	367/26 <sup>ab</sup> ± 65/70	2506/70 <sup>a</sup> ± 113/20	2903/70 <sup>ab</sup> ± 486/26	3935/25 <sup>a</sup> ± 526/08
ویتامین E	778/87 <sup>c</sup> ± 111/00	2987/46 <sup>c</sup> ± 202/98	3787/94 <sup>c</sup> ± 322/87	5068/02 <sup>c</sup> ± 662/60

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند. میانگین‌های با کد حرفهای متفاوت، دارای تفاوت معنی دار می‌باشند (One way ANOVA, Tukey test ( $p < 0/05$ )).

جدول 4. مقایسه میانگین ضخامت منطقه شفاف ( $\mu\text{m}$ ) فولیکول‌های ثانویه، آنترال و گراف در گروه‌های مختلف پس از 120 روز تیمار با سدیم آرسنیت (8 میلی گرم بر کیلوگرم در روز) و ویتامین E (100 میلی گرم بر کیلوگرم در روز) از زمان حاملگی تا بلوغ جنسی

گروهها	ثانویه	آنترال	گراف
کنترل	10/5 <sup>a</sup> ± 0/6	13/1 <sup>a</sup> ± 2/3	14/2 <sup>a</sup> ± 0/9
سدیم آرسنیت	8/7 <sup>b</sup> ± 0/9	9/6 <sup>b</sup> ± 1/7	12/9 <sup>ab</sup> ± 1/3
سدیم آرسنیت + ویتامین E	9/8 <sup>ab</sup> ± 0/8	12/0 <sup>ab</sup> ± 1/6	15/5 <sup>ac</sup> ± 1/1
ویتامین E	12/6 <sup>c</sup> ± 0/93	13/4 <sup>a</sup> ± 2/0	16/1 <sup>ac</sup> ± 1/4

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند. میانگین‌های با کد حرفهای متفاوت، دارای تفاوت معنی دار می‌باشند (One way ANOVA, Tukey test ( $p < 0/05$ )).

## بحث

معلوم شد که سدیم آرسنیت بر روی تعداد کل فولیکول‌های تخمدان، تعداد فولیکول‌های بدوی و ثانویه و آنترال و هم چنین گراف اثر گذاشت و باعث کاهش آنها به صورت معنی دار شد. علاوه بر این تعداد فولیکول‌های آترزی در گروه سدیم آرسنیت نسبت به گروه کنترل افزایش معنی دار نشان داد و تیمار همزمان ویتامین E با سدیم آرسنیت در گروه سدیم آرسنیت + ویتامین E توانست اثر سوء سدیم آرسنیت را بر روی تعداد فولیکول‌ها جبران کند.

میانگین ضخامت منطقه شفاف ( $\mu\text{m}$ ) در فولیکول‌های ثانویه در گروه سدیم آرسنیت نسبت به کنترل و ویتامین E کاهش معنی دار ( $p < 0/005$ ) نشان داد و در گروه ویتامین E نسبت به گروه کنترل و سدیم آرسنیت + ویتامین E افزایش معنی داری ( $p < 0/001$ ) مشاهده شد و گروه سدیم آرسنیت + ویتامین E نسبت به گروه‌های کنترل و سدیم آرسنیت تغییر معنی داری نشان نداد ( $p > 0/05$ ). میانگین ضخامت منطقه شفاف ( $\mu\text{m}$ ) در فولیکول‌های آنترال در گروه سدیم آرسنیت نسبت به کنترل و ویتامین E کاهش معنی دار ( $p < 0/025$ ) نشان داد ولی در گروه ویتامین E نسبت به کنترل تغییری مشاهده نشد ( $p > 0/05$ ). و هم چنین در گروه سدیم آرسنیت + ویتامین E نیز نسبت به سایر گروه‌ها تغییر معنی داری مشاهده نشد ( $p > 0/05$ ). میانگین ضخامت منطقه شفاف ( $\mu\text{m}$ ) در فولیکول‌های گراف در گروه سدیم آرسنیت نسبت به گروه سدیم آرسنیت + ویتامین E و ویتامین E کاهش معنی دار ( $p < 0/007$ ) نشان داد اما در گروه کنترل نسبت به سایر گروه‌ها تغییر معنی داری مشاهده نشد ( $p > 0/05$ ). هم چنین در گروه ویتامین E نسبت به گروه سدیم آرسنیت + ویتامین E تغییر معنی داری دیده نشد ( $p > 0/05$ ) (جدول 4).



سلول‌های گرانولوزا جلوگیری کنند (22). همان‌طور که گفته شد آرسنیک می‌تواند باعث کاهش LH و FSH شود (8، 21). بنابراین چون سلول‌های گرانولوزا در اثر کاهش FSH و LH دچار آپوتوزیس می‌شوند، حالت چروکیدگی به خود می‌گیرند که می‌تواند باعث چروکیدگی فولیکول‌ها و حتی آپوتوزیس در آنها شود که این می‌تواند تکامل اووسیت را تحت تاثیر قرار دهد. ویتامین E با اثر بر روی لب قدامی هیپوفیز باعث افزایش تحریک ترشح هورمون‌های FSH و LH می‌گردد (23). بنابراین می‌تواند اثرات ناشی از کاهش سطح FSH و LH را که در اثر سدیم ارسنیت ایجاد شده است را بهبود ببخشد. اختلال در تکامل اووسیت‌ها می‌تواند ناشی از کاهش میزان هورمون‌های تخمدانی باشد و آرسنیک نیز باعث اختلال در تولید استرادیول‌ها می‌شود (24). از طرفی ویتامین E با اثر بر روی لب قدامی هیپوفیز باعث افزایش تحریک ترشح هورمون‌های تخمدانی می‌شود (23). هم‌چنین ویتامین E با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند رادیکال‌های آزاد ایجاد شده در اثر سدیم ارسنیت در تخمدان را (21) پاک سازی و از ایجاد اختلال در فولیکول‌نریز (25) جلوگیری نماید و از این طریق بر روی رشد و تکامل اووسیت نیز اثر مثبت داشته باشد. در این مطالعه ضخامت زونا پلوسیدا در فولیکول‌های ثانویه و آنترال در گروه سدیم ارسنیت نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد و در گروه سدیم ارسنیت + ویتامین E، ویتامین E قادر به جبران اثرات سوء آرسنیک بر روی ضخامت زونا پلوسیدا در فولیکول‌های ثانویه و آنترال شد. با توجه به این که منطقه شفاف از گلیکوپروتئین‌ها تشکیل شده و همان‌طور که اشاره شد سدیم ارسنیت با کاهش میزان FSH و LH در ماده‌ها (21) می‌تواند باعث کاهش اکسیداسیون گلوکز و در نتیجه کاهش ساخت پروتئین شود، بنابر این کاهش ضخامت منطقه شفاف نتیجه‌ای دور از انتظار نخواهد بود. همان‌طور که گفته شد آرسنیک می‌تواند باعث کاهش LH و FSH شود، چون سلول‌های گرانولوزا در اثر کاهش FSH و LH دچار آپوتوزیس می‌شوند، حالت چروکیدگی به

در یک بررسی مشخص شد که آرسنیک در دوز 14 میلی‌گرم بر لیتر در طی 30 روز باعث افزایش تعداد فولیکول‌های آترزی می‌شود (15). در بررسی دیگری، بعد از تیمار آرسنیک تعداد فولیکول‌های سالم کاهش یافته بود و تعداد فولیکول‌های آترزی افزایش یافته بود که به دلیل کاهش سطح هورمون FSH بود (16). کاهش سطح پر اکسیداز در مایع فولیکولی یا غلظت بالای رادیکال سوپر اکسیداز ممکن است از فاکتورهای مهم تخریب فولیکولی باشند (17). پراکسیداز یکی از مهم‌ترین ترکیبات سیستم آنتی‌اکسیدانی است (18-20). از آنجایی که آرسنیک قادر است که بیشتر از 200 آنزیم را مهار کند. مشخص شده است که سطح فعالیت پراکسیداز در بافت تخمدانی بعد از تیمار سدیم ارسنیت پایین است (8). کاهش در میزان پروتئین‌های با مهار سنتز DNA توسط آرسنیک ارتباط دارد. کمبود پروتئین‌های کافی اثرات نامطلوبی بر روی آنزیم‌ها، رسپتورها، پروتئین‌های ساختمانی و رشد تخمدانی دارد. بنابراین کاهش در تعداد فولیکول‌های گراف، ثانویه و پرایمری می‌تواند ناشی از کمبود پروتئین‌های مورد نیاز برای تقسیم سلولی، رشد و تمایز سلول‌های ژرم در طی اووژنسیس باشد. ویتامین E آنتی‌اکسیدانی قوی است که توانایی دارد از آسیب‌های سلولی به وسیله نگهداری گروه سولفیدریل پروتئین‌های متصل شونده به غشا و از بین بردن رادیکال‌های آزاد جلوگیری کند (21). در این مطالعه، در گروه سدیم ارسنیت حجم اووسیت در فولیکول‌های بدوی، اولیه نسبت به گروه کنترل کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان داد. در گروه سدیم ارسنیت حجم هسته اووسیت در فولیکول‌های اولیه، ثانویه، آنترال و گرآف نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد. در گروه سدیم ارسنیت + ویتامین E، ویتامین E باعث جبران اثرات سوء سدیم ارسنیت تا حد گروه کنترل شد. آرسنیت می‌تواند باعث کاهش تکامل اووسیت شود و احتمالاً این کاهش در تکامل اووسیت باعث کاهش حجم اووسیت می‌شود و هم‌چنین کاهش قطر هسته باعث کاهش حجم هسته اووسیت می‌شود. گنادوتروپین‌ها می‌توانند از آپوتوزیس

- fibroblasts(VH25). *Int J Hum Genet.* 2005; 5(3): 165-72.
3. Chattopadhyay S, Ghosh S, Debnath J, Ghosh D. Protection of sodium arsenite-induced ovarian toxicity by coadministration of L-ascorbate (vitamin C) in mature wistar strain rat. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2001;41(1):83-9.
4. Jana K, Jana S, Samanta P. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006;4:9.
5. Mozafarian K, Madaeni S, Khoshnodie M. Evaluating the performance of reverse osmosis in Arsenic removal from water. *Water & Wastewater.* 2007;17(60):22-8.
6. Done AK, Peart AJ. Acute toxicities of arsenical herbicides. *Clin Toxicol.* 1971; 4(3): 343-55.
7. Mittal M, Flora SJ. Vitamin E supplementation protects oxidative stress during arsenic and fluoride antagonism in male mice. *Drug Chem Toxicol.* 2007;30(3):263-81.
8. Chattopadhyay S, Pal Ghosh S, Ghosh D, Debnath J. Effect of dietary co-administration of sodium selenite on sodium arsenite-induced ovarian and uterine disorders in mature albino rats. *Toxicol Sci.* 2003;75(2):412-22.
9. Shariatzadeh S, Malekirad A, Fani A, Dezfulian A. Free radicals antioxidants impacts on health and disease. *Tehran: Ayizh;* 2007.
10. Soleymani Mehranjani M, Shariatzadeh S, Maleki P, Mahmoudi M. Quantitative study of the histopathological effects of sodium Arsenite on kidney structure in rats. *Arak Medical University Journal.* 2008;10(41):57-63.
11. Soleimani Mehranjani M, Hemadi M. The effects of Sodium Arsenite on the testis structure and sex hormones in vasectomised rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine.* 2007; 15(3):127-33.
12. Kyselova V, Peknicova J, Buckiova D, Boubelik M. Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight and in vivo fertility of outbred CD-1 mice. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;1:30.
13. Howard V, Reed MG. Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy: *Bios;* 1998.

خود می گیرند که می تواند باعث چروکیدگی فولیکول ها و حتی آپوپتوزیس در آنها شود که این می تواند تکامل اووسیت را تحت تاثیر قرار دهد. در نتیجه احتمالاً از این طریق بتواند باعث کاهش ضخامت زونا پلوسیدا شود. ویتامین E با اثر بر روی لب قدامی هیپوفیز باعث افزایش تحریک ترشح هورمون های FSH و LH می گردد (24). بنابراین می تواند اثرات ناشی از کاهش سطح FSH و LH را که در اثر سدیم آرسنیت ایجاد شده است، بهبود ببخشد.

### نتیجه گیری

باتوجه به نتایج حاصل از این تحقیق ویتامین E می تواند اثرات نامطلوب ناشی از تیمار با سدیم آرسنیت را روی ساختمان تخمدان رت جبران نماید. همچنین در این تحقیق مشاهده شد که به کار بردن ویتامین E می تواند بیشتر آسیب های وارد شده توسط سدیم آرسنیت بر روی تخمدان رت را جبران کند. بنابراین مصرف این ویتامین، در شرایط مسمومیت با سدیم آرسنیت توصیه می شود.

### تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر حاصل پایان نامه دانشجویی مصوب معاونت پژوهشی دانشکده علوم دانشگاه اراک با عنوان "مطالعه استریولوژیکی اثر ویتامین E در جلوگیری از اثرات زیان آور سدیم آرسنیت بر تکامل و ساختمان تخمدان رت" در سال 1389 می باشد و با حمایت مالی این دانشگاه به انجام رسیده که بدین وسیله تشکر می گردد. همچنین نویسندگان بر خود لازم می دانند از زحمات سرکار خانم محمودی کارشناس آزمایشگاه در کمک به انجام این آزمایشات کمال تشکر را مبذول دارند.

### منابع

1. Ng JC. Environmental Contamination of Arsenic and its Toxicological Impact on Humans. *Environmental Chemistry.* 2005; 2(3): 146-60.
2. Saraswathy R. Coclastogenic effects of Sodium Arsenite on Chinese hamster ovary cells(CHO) and primary human

14. Ferrando RE, Nyengaard JR, Hays SR, Fahy JV, Woodruff PG. Applying stereology to measure thickness of the basement membrane zone in bronchial biopsy specimens. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112(6):1243-5.
15. Shukla JP, Pandey K. Impaired ovarian functions in arsenic-treated freshwater fish, *Colisa fasciatus* (bl. and sch.). *Toxicol Lett.* 1984;20(1):1-3.
16. Gore-Langton RE, Daniel SA. Follicle-stimulating hormone and estradiol regulate antrum-like reorganization of granulosa cells in rat preantral follicle cultures. *Biol Reprod.* 1990; 43(1):65-72.
17. Cassano E, Tosto L, Balestrieri M, Zicarelli L, Abrescia P. Antioxidant defense in the follicular fluid of water buffalo. *Cell Physiol Biochem.* 1999;9(2):106-16.
18. Hochstein P, Atallah AS. The nature of oxidants and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. *Mutat Res.* 1988; 202(2):363-75.
19. Sun Y. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 1990;8(6):583-99.
20. Susa N, Ueno S, Furukawa Y, Sugiyama M. Protective effect of vitamin E on chromium (VI)-induced cytotoxicity and lipid peroxidation in primary cultures of rat hepatocytes. *Arch Toxicol.* 1996;71(1-2):20-4.
21. Jhala D, Nair S, Chinoy N. Reversible toxicity of Fluoride and Arsenic in ovary of mice. *Fluoride.* 2004;37(2):71-9.
22. Tilly JL, Tilly KI. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology.* 1995; 136(1): 242-52.
23. Berne RM, Levy MN, Koepfen BM, Stanton BA. *Physiology: Mosby*; 2004.
24. Hinshelwood M, Demeter-Arlotto M, Means G, Simpson E. Expression of genes encoding steroidogenic enzymes in the ovary. In: Findlay J, editor. *Molecular biology of the female reproductive system.* 6<sup>th</sup> ed: Elsevier; 1994. p. 129-45.
25. Nestorović N, Lovren M, Sekulić M, Negić N, Sosić-Jurjević B, Filipović B, et al. Chronic somatostatin treatment affects pituitary gonadotrophs, ovaries and onset of puberty in rats. *Life Sci.* 2004;74(11):1359-73.