

اثر حفاظتی روغن سیاه دانه بر سمیت القا شده توسط بیس فنول A بر بافت بیضه موش بالغ

ملک سلیمانی مهرنجانی^۱ Ph.D.، محمد علی شریعت زاده^۲ Ph.D.، مهدی آزادپور^۲ M.Sc.۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کدپستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-soleimani@araku.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۲۸

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثر حفاظتی روغن سیاه دانه به عنوان یک آنتی اکسیدانت بر بافت بیضه موش‌های تیمار شده با بیس فنول A بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۲۴ سر موش نر بالغ NMRI به چهار گروه (n=۶): کنترل، بیس فنول A (۲۰۰ mg/kg/day)، روغن سیاه دانه (۵ ml/kg/day) و بیس فنول A + روغن سیاه دانه تقسیم شدند. ۳۴ روز پس از تیمار دهانی با اندازه‌گیری وزن موش، بیضه راست خارج و فیکس شد. پارامترهای مورفومتریک بافت بیضه پس از انجام برش گیری، پاساژ بافتی و رنگ آمیزی Heidenhain's Azan، توسط روش استریولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: میانگین حجم لوله‌های منی‌ساز، ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی، قطر و ضخامت غشا پایه لوله‌های منی‌ساز، تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت، اسپرماتید گرد و دراز، اسپرماتوگونی و سلول‌های سرتولی در گروه بیس فنول A نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد ($P < 0/05$). افزایش میانگین حجم لوله‌های منی‌ساز و تعداد سلول‌های سرتولی در گروه بیس فنول A + روغن سیاه دانه در حد گروه کنترل بود اما میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت و اسپرماتید گرد و دراز در این گروه نسبت به گروه بیس فنول A دارای افزایش معنی‌داری شد ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: مصرف هم‌زمان روغن سیاه دانه و بیس فنول A از اثرات نامطلوب بیس فنول A بر بافت بیضه موش بالغ جلوگیری نمود.

واژگان کلیدی: استریولوژی، بیس فنول A، بیضه، روغن سیاه دانه، لوله‌های منی‌ساز

مقدمه

موثره اصلی در عصاره آبی دانه گیاه هستند (۱۵-۱۲). این گیاه طیف گسترده‌ای از خواص پزشکی را دارد که شامل اثرات ضد میکروب، ضد تومور، ضد ویروس، ضد التهاب و آنتی‌اکسیدانت می‌باشد (۱۶). تحقیقات نشان داده است که بیشتر فعالیت بیولوژیکی دانه این گیاه مربوط به تیموکوینون (TQ)، یعنی جز اصلی روغن فرار دانه گیاه سیاه دانه است. هم روغن و هم اجزای تشکیل دهنده سیاه دانه و به‌ویژه تیموکوینون دارای خواص آنتی‌اکسیدانتی و ضد التهابی است و خواص ضد التهاب آن از طریق سرکوب واسطه‌های التهابی مانند پروستاگلندین‌ها و لکوترین‌ها اعمال می‌شود (۱۷ و ۱۸). اسیدهای چرب غیر اشباع در روغن سیاه دانه فعالیت آنزیم - هیدروکسی استروئید دهیدروژناز را تحریک می‌کند، این آنزیم، در مسیر سنتز تستوسترون نقش دارد. همچنین سیاه دانه به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت روی بیضه، غدد ضمیمه، اپی‌دیدیم و اسپرم اثر می‌گذارد و از آسیب رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند (۱۹، ۲۰ و ۲۱). این مطالعه به‌منظور تعیین اثر روغن سیاه دانه بر اثرات بیس فنول A روی بافت بیضه موش بالغ نژاد NMRI انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی روی ۲۴ سر موش نر بالغ نژاد NMRI با وزن تقریبی 33 ± 3 گرم خریداری شده از انستیتو پاستور ایران در دانشگاه اراک طی سال ۱۳۹۳ انجام شد.

موش‌ها در خانه حیوانات و در شرایط استاندارد شامل دمای 21 ± 2 درجه سانتی‌گراد، نور محیطی با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. سپس حیوانات به‌طور تصادفی در ۴ گروه ۶ تایی شامل کنترل، بیس فنول A (200 mg/kg/day)، روغن سیاه دانه (5 ml/kg/day) و روغن سیاه دانه (5 ml/kg/day) + بیس فنول A (200 mg/kg/day) گروه‌بندی و به‌صورت دهانی تیمار شدند.

بیس فنول A، از شرکت (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) و روغن سیاه دانه از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج خریداری و مورد استفاده قرار گرفت.

سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت Merck آلمان تهیه شد. دوز بیس فنول A بر اساس دوزهای مورد استفاده در

بیس فنول A (BPA) یک ماده زئوستروژن است که در تولید مونومرهای پلی‌کربنات و رزین‌های اپوکسی و پلیمرهای سبک ولی سخت استفاده می‌شود مثل: شیشه کودکان، ظروف، شیشه‌های شیر، بطری‌های آب معدنی، روکش رنگی مواد ساختمانی (۱ و ۲). بیس فنول A می‌تواند از طریق بسته بندی مواد غذایی مثل ظروف پلاستیکی پلی‌کربنات و قوطی‌های نوشیدنی وارد مواد غذایی شده و در نهایت وارد بدن شود (۳). انسان‌ها از طریق رژیم غذایی خود، استنشاق گرد و غبار خانگی و پوست در معرض بیس فنول A هستند (۴).

آزمایشات انجام گرفته در هر دو محیط آزمایشگاهی و موجود زنده نشان داده که BPA به‌عنوان یک ماده شیمیایی تخریب کننده اندوکراین (EDC) عمل می‌کند (۵). مشابه با استروژن‌های دیگر BPA می‌تواند به رسپتورهای استروژنی متصل شود و از عمل آندروژن‌ها ممانعت کند. شواهد نشان می‌دهد که بیس فنول A می‌تواند روی تکامل گنادها، غدد ضمیمه و اسپرماتوژنز تأثیر بگذارد، که این اثر به‌وسیله عمل مستقیم بر روی برهم‌کنش‌های بین سلول‌های سرتولی و رده سلول‌های زایگر ایجاد می‌شود (۶ و ۷). تحقیقات نشان داده که قرار گرفتن جوندگان در معرض بیس فنول A در دوران بارداری، باعث اختلال در عمل‌کرد غدد درون ریز و سیستم تولید مثلی نوزادان نر و ماده می‌شود (۸). مشاهده شده که BPA باعث افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و لیپید پراکسیداسیون دریافت بیضه رت‌های بالغ نیز می‌شود (۹). بیس فنول A همچنین موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی مثل سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون می‌گردد و باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و آسیب بافتی در بیضه، مغز، کبد، کلیه و دیگر اندام‌ها می‌شود. افزایش استرس اکسیداتیو در بیضه لیپید پراکسیداسیون غشا را نیز به‌دنبال خواهد داشت (۱۰ و ۱۱).

گیاه سیاه دانه با نام علمی (*Nigella sativa*) یک گیاه سالانه و بومی جنوب و جنوب غربی آسیاست. از دانه گیاه سیاه دانه چهار نوع آکالوئید به‌نام‌های nigellidine, nigellimine, nigellone و nigellimine-N-oxide استخراج شده است. تیموکوینون، دی تیموکوینون، تیموهیدروکوینون و تیمول مواد

موش ایجاد شد. سپس دو قطر عمود بر هم اندازه گیری و میانگین شعاع آن محاسبه شد و به عنوان شعاع قبل از تثبیت بافتی در نظر گرفته شد. پس از تثبیت بافتی، پردازش بافت (پاساژ بافتی)، برش گیری و رنگ آمیزی مجدداً اندازه گیری قطر قطعات همانند بالا انجام شد و میانگین شعاع حاصله به عنوان شعاع پس از تثبیت در نظر گرفته شد. مقدار چروکیدگی در هر بیضه برآورد شد (۲۸). برای به دست آوردن حجم واقعی بیضه، مقدار چروکیدگی از حجم حاصل از روش غوطه وری کم شد.

به منظور محاسبه حجم لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی، با استفاده از روش نمونه‌گیری تصادفی منظم، به‌طور میانگین ۵ میدان دید از هر برش ۵ میکرومتری به‌وسیله قرار دادن تصادفی پروب نقطه‌ای بر روی هر میدان دید، مورد بررسی قرار گرفت. کل نقاط برخورد کرده از پروب با کل میدان دید انتخاب شده و به همین ترتیب نقاط برخورد کرده با لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی شمارش گردید و دانسیته حجمی هر یک از آن‌ها محاسبه شد (۲۸).

برای محاسبه میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز از میکروسکوپ Olympus DP12 مجهز به یک دوربین و از فریم مخصوص شمارش استفاده شد. برای این کار از میدان‌های دید مربوط به محاسبه طول لوله‌های منی‌ساز عکس گرفته شد و قطر عمود بر محور طولی حدود ۱۳۰ تا ۱۵۰ لوله منی‌ساز با استفاده از نرم افزار موتیک (Motic image 2000) اندازه گیری شد (۲۹).

برای محاسبه ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی با استفاده از ابژکتیو با بزرگ‌نمایی ۱۰ به‌طور متوسط ۵ میدان دید از هر برش ۵ میکرومتری بافت بیضه مربوط به هر موش مورد مطالعه قرار گرفت. برای به دست آوردن دانسیته حجمی اپی‌تلیوم زایشی، کل نقاط برخورد کرده از پروب با تصویر بافت بیضه مربوط به هر میدان دید شمارش و سپس تعداد کل نقاط برخورد کرده با اپی‌تلیوم زایشی نیز شمارش شد و بر مجموع نقاط برخورد کرده با بافت بیضه تقسیم شد. بدین ترتیب دانسیته حجمی اپی‌تلیوم زایشی به دست آمد. سپس دانسیته سطح اپی‌تلیوم زایشی محاسبه شد (۲۸).

به منظور محاسبه میانگین ضخامت غشا پایه لوله‌های منی‌ساز از روش اندازه‌گیری هارمونیک (Harmonic) استفاده شد (۳۰). ۲۴

تحقیقات قبلی با پیامدهای آسیب‌شناختی بر روی سیستم تناسلی موش نر NMRI انتخاب شد (۲۲) و دوز روغن سیاه دانه (۲۳) نیز بر همین اساس انتخاب شد. مدت زمان قرارگیری در معرض بیس فنول A، ۳۴ روز بود که زمان مورد نیاز برای تکمیل یک دوره کامل اسپرماتوژنز است (۲۴) و تیمار با روغن سیاه دانه نیز به همراه تیمار با بیس فنول A انجام گردید.

در پایان دوره تیمار ابتدا موش‌ها وزن و سپس با استفاده از دی اتیل اتر بی‌هوش شدند و پس از تشریح، بیضه راست آن‌ها خارج و پس از تمیز کردن وزن شد و حجم بیضه با استفاده از روش غوطه وری (Immersion) (۲۵) برآورد گردید. سپس برای انجام ثبوت بافتی در محلول ثبوتی اصلاح شده داویدسون (۲۶) به مدت یک هفته با دو بار تعویض محلول ثبوتی قرار داده شد. لازم به ذکر است که تمامی اصول بهداشتی در نگه‌داری و معدوم سازی حیوانات بر اساس پروتکل اخلاقی انجام شد.

از روش Orientator برای به دست آوردن برش‌های IUR (هم‌شکل و هم‌سان تصادفی) استفاده شد (۲۷). به این منظور، بیضه‌ها به‌طور تصادفی در ساعت فی () که به نه قسمت مساوی تقسیم شده بود؛ قرار داده شد. سپس با انتخاب یک عدد تصادفی از یک تا نه بیضه در امتداد عدد انتخاب شده برش زده شد. نتیجه این برش ایجاد دو قطعه از بیضه بود. قطعه اول بر روی ساعت تتا که به ۹ قسمت نابرابر تقسیم شده بود؛ طوری قرار گرفت که سطح برش خورده در طول محور ۰-۰ ساعت تتا () قرار گرفت. سپس یک عدد تصادفی انتخاب و برشی موازی در امتداد عدد انتخاب شده، زده شد. ادامه برش‌ها به‌صورت موازی و مساوی با برش اول زده شد و قطعه دوم به اندازه ۹۰ درجه چرخانده شد تا سطح برش خورده مماس بر محور ۰-۰ ساعت تتا قرار گرفت. سپس یک عدد تصادفی انتخاب و برش‌ها به موازات عدد انتخاب شده تهیه شدند (۲۷). اسلایدهای تهیه شده از هر بیضه با حفظ جهت، پاساژ بافتی داده شد و پس از تهیه قالب‌های پارافینی توسط میکروتوم (Leitz 1512) مقاطع با ضخامت ۵ و ۲۰ میکرومتر تهیه و با روش رنگ آمیزی هایدن هان آزان رنگ آمیزی شد.

به منظور محاسبه چروکیدگی با استفاده از تروکار به‌صورت تصادفی سه قطعه گرد از برش‌های IUR به دست آمده از بیضه هر

آنالیز آماری: داده‌های حاصل توسط نرم افزار SPSS-16 و روش آنالیز واریانس یک طرفه و تست Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و تفاوت میانگین‌ها در سطح کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

از مقایسه میانگین حجم کل بیضه موش‌ها در بین گروه‌های مختلف موش اختلاف آماری معنی داری مشاهده نشد، اما میانگین حجم لوله‌های منی‌ساز (mm^3) در گروه بیس فنول A نسبت به سایر گروه‌ها کاهش معنی داری را نشان داد ($p < 0/01$). همچنین در گروه تیماری هم‌زمان روغن سیاه دانه با بیس فنول A، نسبت به گروهی که فقط بیس فنول A دریافت کرده بودند اختلاف معنی داری مشاهده شد ($p < 0/006$) (جدول ۱).

میانگین طول لوله‌های منی‌ساز در بین چهار گروه تفاوت آماری معنی داری نشان نداد. این در حالی است که کاهش آماری معنی داری در میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز ($p < 0/01$)، ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی ($p < 0/01$) و میانگین ضخامت غشا پایه لوله‌های منی‌ساز ($p < 0/01$) در گروه بیس فنول A نسبت به گروه کنترل دیده شد. افزایش پارامترهای فوق در گروه هم‌زمان روغن سیاه دانه با بیس فنول A نسبت به گروه بیس فنول A معنی دار نبود (جدول ۲).

تا ۲۶ میدان دید از همه اسلایدهای ۵ میکرومتری بافت بیضه هر موش با استفاده از ابژکتیو با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ و روش تصادفی منظم انتخاب شد. سپس یک پروب که دارای خطوط موازی و مساوی (خطوط ایزوتروپیک) بود؛ بر روی عکس‌های گرفته شده از مقطع بیضه انداخته شد و از محل برخورد خطوط پروب با غشا داخلی غشاء پایه یک خط عمود بر خط مماس غشا خارجی کشیده شد و سپس طول این خط توسط نرم افزار موتیک اندازه گیری شد و میانگین ضخامت غشاء پایه محاسبه گردید.

به منظور محاسبه طول لوله‌های منی‌ساز حدود ۵ میدان دید (فریم، با سطح 6300 میکرومتر مربع) از هر برش ۵ میکرومتری با استفاده از ابژکتیو با بزرگ‌نمایی ۱۰ انتخاب شد و به‌طور میانگین ۱۳۰ تا ۱۵۰ لوله منی‌ساز در بیضه هر موش با استفاده از فریم شمارش (unbiased counting frame) شمارش گردید (۲۷ و ۲۸). دانسیته طولی لوله‌های منی‌ساز محاسبه شد (۲۸). برای به دست آوردن طول کل لوله‌های منی‌ساز، دانسیته طولی در حجم نهایی بیضه ضرب شد (۲۸).

برای محاسبه تعداد انواع سلول‌ها از روش optical dissector و از فریم مخصوص شمارش استفاده شد (۲۸ و ۳۱). برای این کار با استفاده از ابژکتیو با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ از همه برش‌های ۲۰ میکرومتری بیضه هر موش تعدادی فریم (سطح هر فریم، ۴۶۰ میکرومتر مربع) برای شمارش انواع سلول‌ها، انتخاب شد و میکروکیتور (ND 221 B, Heidenhain, Germany) برای شمارش مورد استفاده قرار گرفت. سپس دانسیته عددی انواع سلول‌ها محاسبه گردید. برای محاسبه تعداد کل انواع سلول‌های مورد نظر، عدد حاصل در حجم کل بیضه مربوطه ضرب شد.

جدول ۱: مقایسه میانگین حجم کل بیضه (mm^3)، حجم لوله‌های منی‌ساز (mm^3) و حجم بافت بینابینی (mm^3) در گروه‌های مختلف موش ۳۴ روز پس از تیمار با بیس فنول A (200 mg/kg/day) و روغن سیاه دانه (5 ml/kg/day).

گروه‌ها	میانگین حجم لوله‌های منی‌ساز (mm^3)	میانگین حجم کل بیضه (mm^3)	میانگین حجم بافت بینابینی (mm^3)
کنترل	$56/60 \pm 5/13^a$	$72/55 \pm 6/91^a$	$15/95 \pm 1/89^a$
بیس فنول A	$45/41 \pm 7/22^b$	$63/86 \pm 8/66^a$	$18/45 \pm 1/76^a$
بیس فنول A + روغن سیاه دانه	$58/84 \pm 4/72^a$	$75/43 \pm 4/57^a$	$16/59 \pm 1/84^a$
روغن سیاه دانه	$58/14 \pm 7/07^a$	$73/58 \pm 7/91^a$	$15/44 \pm 2/35^a$

جدول ۲: مقایسه میانگین طول (m)، قطر (um)، ضخامت غشاء پایه (um) و ارتفاع اپی تلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز (um) در گروه‌های مختلف موش ۳۴ روز پس از تیمار با بیس فنول A (۲۰۰ mg/kg/day) و روغن سیاه دانه (۵ ml/kg/day).

گروه‌ها	ضخامت غشا پایه لوله‌های منی‌ساز (um)	قطر لوله‌های منی‌ساز (um)	طول لوله‌های منی‌ساز (m)	ارتفاع اپی تلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز (um)
کنترل	۴/۸۳±۰/۳۶ ^a	۲۰۰/۷۷±۵/۸۶ ^a	۱/۸۱±۰/۱۵ ^a	۵۹/۷۶±۴/۹۷ ^a
بیس فنول A	۴/۱۴±۰/۳۵ ^b	۱۸۵/۹۳±۶/۸۱ ^b	۱/۶۵±۰/۲۴ ^a	۴۸/۵۸±۲/۸۳ ^b
بیس فنول A + روغن سیاه دانه	۴/۵۶±۰/۴۱ ^{ab}	۱۹۱/۴۲±۷/۹۹ ^{ab}	۱/۹۴±۰/۲۴ ^a	۵۴/۵۸±۹/۷۵ ^{ab}
روغن سیاه دانه	۴/۸۷±۰/۱۴ ^a	۱۹۷/۱۵±۶/۷۵ ^a	۱/۸۶±۰/۳۶ ^a	۵۸/۷۵±۴/۶۳ ^a

سلول‌های اسپرماتوسیت و اسپرماتید دراز و گرد نسبت به گروه کنترل نیز دارای تفاوت معنی‌داری بود (p<۰/۰۰۲). میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه تیماری هم‌زمان با روغن سیاه دانه و بیس فنول A دارای اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نبود (جدول ۳).

میانگین وزن بدن موش و وزن بیضه نیز پس از اتمام دوره تیمار در بین گروه‌های مختلف اختلاف آماری معنی‌داری نشان نداد (جدول ۴).

کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی (p<۰/۰۰۳)، سرتولی (p<۰/۰۱)، اسپرماتوسیت (p<۰/۰۰۱)، اسپرماتید دراز (p<۰/۰۰۱) و اسپرماتید گرد (p<۰/۰۰۱) در گروه بیس فنول A نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. از طرفی میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت، اسپرماتید دراز و گرد و سرتولی (در حد گروه کنترل) در گروه تیماری هم‌زمان با بیس فنول A و روغن سیاه دانه دارای افزایش معنی‌داری نسبت به گروه بیس فنول A بود (p<۰/۰۳). علاوه بر این میانگین تعداد

جدول ۳: مقایسه میانگین تعداد انواع سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید (گرد و دراز)، سرتولی (×۱۰^۶) در گروه‌های مختلف موش ۳۴ روز پس از تیمار با بیس فنول A (۲۰۰ mg/kg/day) و روغن سیاه دانه (۵ ml/kg/day).

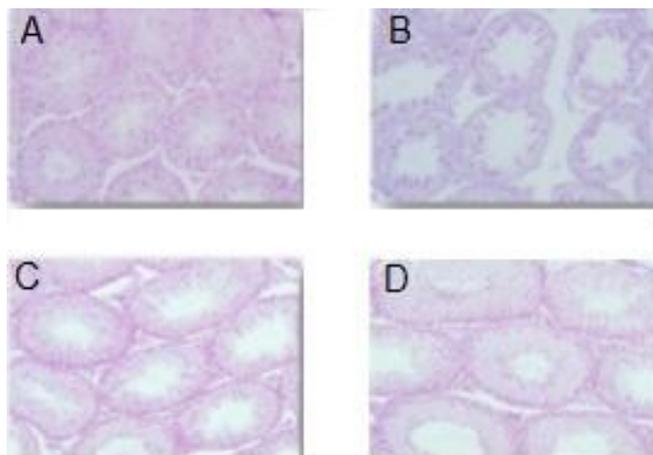
گروه‌ها	میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید گرد ×۱۰ ^۶	میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید دراز ×۱۰ ^۶	میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت ×۱۰ ^۶	میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی ×۱۰ ^۶	میانگین تعداد سلول‌های سرتولی ×۱۰ ^۶
کنترل	۴۰/۱±۱/۷۹ ^a	۳۹/۴±۱/۷۹ ^a	۲۱/۵±۱/۷۶ ^a	۵/۵±۰/۴۱ ^a	۳/۸۶±۰/۳۲ ^a
بیس فنول A	۲۸/۱±۱/۱۸ ^b	۲۷/۷±۱/۲۱ ^b	۱۲/۶±۷/۱۷ ^b	۴/۵±۰/۵۲ ^b	۳/۲±۰/۴۷ ^b
بیس فنول A + روغن سیاه دانه	۳۲/۸±۱/۴۷ ^c	۳۳/۵±۱/۰۷ ^c	۱۷/۵±۱/۷۹ ^c	۵/۲±۰/۳۹ ^{ab}	۳/۸۰±۰/۲۱ ^a
روغن سیاه دانه	۳۹/۰±۳/۵۱ ^a	۳۸/۲±۲/۰۷ ^a	۲۱/۳±۱/۹۵ ^a	۵/۳±۰/۳۷ ^a	۳/۷۹±۰/۳۴ ^a

جدول ۴: مقایسه میانگین وزن بیضه (میلی‌گرم) و وزن موش (گرم) در گروه‌های مختلف موش ۳۴ روز پس از تیمار با بیس فنول A (۲۰۰ mg/kg/day) و روغن سیاه دانه (۵ ml/kg/day).

گروه‌ها	میانگین وزن موش در پایان تیمار (گرم)	میانگین وزن اولیه موش (گرم)	میانگین وزن بیضه (میلی‌گرم)
کنترل	۳۴/۶۳±۰/۹۳ ^a	۳۲/۸۵±۳/۲۲ ^a	۱۰۸/۳۳±۱۴/۷۲ ^a
بیس فنول A	۳۴/۳۳±۳/۰۵ ^a	۳۲/۳۲±۱/۶۴ ^a	۹۳/۳۳±۱۲/۱۱ ^a
بیس فنول A + روغن سیاه دانه	۳۴/۵۳±۶/۷۷ ^a	۳۲/۸۰±۳/۱۲ ^a	۱۱۳/۳۳±۸/۱۶ ^a
روغن سیاه دانه	۳۳/۶۳±۲/۵۴ ^a	۲۹/۴۶±۳/۸۰ ^a	۱۱۱/۶۷±۱۶/۰۳ ^a

سیاه دانه اکثر تغییرات تخریبی ایجاد شده به وسیله بیس فنول آ با تجویز روغن سیاه دانه تا حدودی برگشت و تعدیل یافته بود (شکل C-1). در گروه روغن سیاه دانه نیز ساختار لوله های منی ساز و ضخامت اپیتلیوم زایشی تقریباً مشابه گروه کنترل بود (شکل D-1).

لوله های منی ساز در گروه کنترل اسپرماتوزنز طبیعی داشته، اپیتلیوم زایشی لوله ها شکل طبیعی خود را حفظ کرده و سلول ها دارای نظم و ترتیب و بهم پیوستگی بود (شکل A-1). در بیضه های موش های گروه بیس فنول آ آتروفی لوله های منی ساز مشاهده شد (شکل B-1). همچنین در گروه بیس فنول آ+روغن



شکل ۱: بافت بیضه موش های بالغ در گروه های مختلف، تیمار شده با بیس فنول A (200 mg/kg/day) و روغن سیاه دانه (5 ml/kg/day)، (برش های 5 میکرومتری ، رنگ آمیزی هایدن هان آزان، بزرگنمایی $200\times$)، (A) اپیتلیوم زایشی در گروه کنترل، (B) کاهش ضخامت اپیتلیوم زایشی و بی نظمی اپیتلیوم زایشی در گروه تیمار شده با بیس فنول آ، (C) نمای لوله های منی ساز در گروه تیمار شده با بیس فنول آ+روغن سیاه دانه، (D) اپیتلیوم زایشی در گروه تیمار شده با روغن سیاه دانه.

بحث

است (۳۳). بنابراین اثرات مشاهده شده در این مطالعه را می توان تا حدی ناشی از اثرات استرس اکسیداتیوی BPA دانست. نتایج مطالعه حاضر کاهش معنی داری را در قطر و ارتفاع اپیتلیوم زایشی لوله های منی ساز نشان داد. در مطالعه Atsushi و همکارانش (۳۴) بر روی موش های ICR والد که با دوزهای $100 \mu\text{g/kg/day}$ و 5 mg/kg/day BPA تیمار شدند، کاهش قطر لوله های منی ساز در نوزادان نر آنها دیده شد. همچنین Tan و همکارانش (۳۵) نشان دادند که بیس فنول A بر اسپرماتوزنز رت ها اثر می گذارد. آنها به رت های نر از ۲۳ تا ۵۳ روز بعد از تولد، دوز 100 mg/kg bw از بیس فنول A را به صورت گاوآژ دادند و مشاهده کردند که بیس فنول A باعث دژنره شدن اپیتلیوم زایشی می شود. بیس فنول A کاهش سطح هورمون تستوسترون، اختلال در اسپرماتوزنز و کم شدن لایه های اپیتلیوم زایشی را موجب می شود (۳۶ و ۳۷). بنابراین تغییر در سطح این هورمون نیز خود ممکن است دلیلی بر کاهش قطر لوله های منی ساز در بیضه موش های تیمار شده با بیس فنول A باشد.

در این مطالعه تیمار موش های بالغ با بیس فنول A به مدت ۳۴ روز باعث کاهش حجم لوله های منی ساز، کاهش قطر، ارتفاع و ضخامت غشا پایه لوله های منی ساز، کاهش تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید دراز و گرد و سرتولی گردید.

از جمله دلایلی که می توان برای اثرات بیس فنول A بر بافت بیضه ذکر کرد، اثر استرس اکسیداتیوی آن است. BPA باعث افزایش سطح رادیکال های آزاد (ROS) و لیپید پراکسیداسیون و کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکوتایون در بافت بیضه می شود (۳۲). بافت بیضه به دلیل دارا بودن درصد بالای اسیدهای چرب غیر اشباع در غشا سلول هایش و درجه بالای متابولیسم و تکثیر سلولی در این بافت، به استرس اکسیداتیو بسیار حساس می باشد که این مساله نشان دهنده پر اهمیت بودن ظرفیت آنتی اکسیدانتی بافت بیضه

در کل با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و نتایج دیگران می‌توان کاهش سلول‌های اسپرماتوسیت، اسپرماتید گرد و دراز و سرتولی را به چند دلیل مربوط دانست. (۱) بر هم خوردن تعادل هورمون‌های جنسی (۲) از آنجایی که سلول‌های جنسی در یک محیط تولید شده توسط سلول‌های سرتولی زندگی می‌کنند (۴۵)، لذا با از بین رفتن سلول‌های سرتولی شرایط مناسب برای زندگی سلول‌های جنسی نیز از بین می‌رود. (۳) افزایش آپوپتوزیس (۴) القا استرس اکسیداتیو.

در مطالعه حاضر روغن سیاه دانه در گروه بیس فنول A + روغن سیاه دانه باعث شد که کاهش در حجم لوله‌های منی‌ساز در حد گروه کنترل بهبود یابد. همچنین قطر، ضخامت غشا پایه و ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز هم در گروه بیس فنول A + روغن سیاه دانه نسبت به گروه بیس فنول آ افزایش داشت اما این تفاوت معنی‌دار نبود. این یافته با گزارشات پیشین هم سو است. نقش روغن سیاه دانه در دستگاه تولید مثلی و بنابراین در تولید مثل به‌وسیله کاهش پراکسیداسیون لیپیدی به اثبات رسیده است. این احتمال وجود دارد که روغن سیاه دانه باعث افزایش سطح گلوکوتایون و گروه‌های تیول شده و این گروه‌ها با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو شوند (۱۹ و ۴۶). بنابراین با توجه به مطالب ذکر شده در مورد اثرات حفاظتی روغن سیاه دانه بر بافت بیضه، دور از انتظار نیست که این روغن موجب بهبود پارامترهای فوق در مطالعه حاضر شده باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که بیس فنول A قادر به القا سمیت در بافت بیضه موش بالغ است و روغن سیاه دانه به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت توانست اثرات نامطلوب آن را بر بافت بیضه جبران کند. با توجه به نتایج این مطالعه و مطالعات دیگران می‌توان نتیجه گرفت که اثرات نامطلوب بیس فنول A بر بافت بیضه موش بالغ عمدتاً به دلیل القا استرس اکسیداتیو توسط این آلاینده بر بافت بیضه است. در نتیجه می‌توان پیشنهاد داد که روغن سیاه دانه را به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت در برابر سمیت بیضوی ایجاد شده بر اثر بیس فنول A استفاده کرد.

ROS ایجاد شده به‌وسیله بیس فنول A نیز می‌تواند باعث لیپید پراکسیداسیون اپی‌تلیوم زایشی شود و قطر لوله‌های منی‌ساز را کاهش دهد (۳۸). کاهش در ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی در موش‌های تیماری با بیس فنول A نیز نشان دهنده کاهش تعداد سلول‌های جنسی در اپی‌تلیوم زایشی و آزاد سازی زود هنگام اسپرماتیدهای نابالغ به لومن است. BPA با آسیب زدن به ارتباطات بین سلول‌های سرتولی در مناطق (Ectoplasmic Specialization) منجر به بی‌ثباتی سد خونی-بیضه‌ای و در نهایت باعث از دست رفتن اسپرماتوسیت‌ها، اسپرماتیدها و آزاد سازی زود هنگام اسپرماتوزوآ به‌داخل لومن می‌شود (۷ و ۳۹). بنابراین احتمال می‌رود BPA از این طریق موجب کاهش ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی شده باشد.

با توجه به این که غشا پایه نیز از جنس پروتئین می‌باشد (۴۰)، این احتمال وجود دارد که بیس فنول A با تاثیر بر روی پروتئین‌های غشا پایه باعث کاهش ضخامت آن شده باشد.

نتایج حاضر کاهش معنی‌داری را در حجم لوله‌های منی‌ساز نشان داد. در این مورد Oishi و Takahashi (۴۱) نیز آتروفی لوله‌های منی‌ساز را در موش‌های بالغ پس از تیمار با بیس فنول A گزارش کردند که با یافته‌های مطالعه حاضر هم‌راستا است. در مطالعه حاضر حجم بیضه در گروه بیس فنول A نسبت به گروه کنترل تغییر معنی‌داری نشان نداد. احتمال دارد که دوز بیس فنول A و طول مدت تیمار در مطالعه حاضر برای القا تغییرات آناتومیکی بزرگ در بیضه موش‌ها کافی نبوده باشد. نتایج نشان داد که در پایان دوره تیمار در وزن بدن و بیضه حیوانات گروه بیس فنول A کاهش صورت نگرفت که با مطالعات پیشین در این ارتباط سازگار است.

تعدادی پروتئین مانند occludin ، zonula occludens-1 ، N-cadherin و connexin 43 در اتصالات بین سلولی در رده سلول‌های سرتولی وجود دارد که بیس فنول A می‌تواند منجر به کاهش بیان ژن یا تغییر جایگاه آن‌ها بر روی غشا شود (۴۲). از این طریق به این اتصالات آسیب وارد کند و اسپرماتوزن را دچار اختلال نماید. برخی مطالعات نیز در محیط *in vitro* نشان داده که BPA موجب آپوپتوز سلول‌های سرتولی می‌شود (۴۳ و ۴۴).

A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol Reprod.* 2001; 65(4): 1215-1223.

9. Aydo an M, Korkmaz A, Barlas N, Kolankaya D. Pro-oxidant effect of vitamin C coadministration with bisphenol A, nonylphenol, and octylphenol on the reproductive tract of male rats. 2010; 33(2): 193-203.

10. Hassan Z, Elobeid MA, Virk P, Omer SA, et al. Bisphenol A Induces Hepatotoxicity through Oxidative Stress in Rat Model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2012; 1 :1-6.

11. Sutiakova I, Kovalkovicova N, Tulenkova M, Sutiak V. Bisphenol A and ITS Potential Toxic effects on living Organisms. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences.* 2012; 2(2): 526-535.

12. Nadkarni K. *Crocus sativus, Nigella sativa.* In: Nadkarni KM editor. *Indian materia medica.* Bombay, India: Popular Prakashan. 1976; 386-411.

13. El-Dakhkhny M. Studies on the Egyptian *Nigella sativa* L: IV. Some pharmacological properties of the seeds' active principle in comparison to its dihydro compound and its polymer. *Arzneimittelforschung.* 1965; 15(10): 1227-1229.

14. Morikawa T, Xu F, Kashima Y, Matsuda H, et al. Novel dolabellane-type diterpene alkaloids with lipid metabolism promoting activities from the seeds of *Nigella sativa*. *Org Lett.* 2004a; 6: 869-872.

15. Morikawa T, Xu F, Ninomiya K, Matsuda H, et al. Nigellamines A3, A4, A5, and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids, with lipid metabolism-promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin. *Chem Pharm Bull.* 2004b; 52: 494-497.

16. Samsamshariat H. *Herb and natural remedies* Isfahan : Mashal publ Inst. 1988; 544-547.

17. Osama A, Badary OA, Ashraf B, Abdel-Naim, et al. The influence of thymoquinone on doxorubicin – induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology.* 2000; 143: 219-226.

18. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int Immunopharmacol.* 2005; 5(13-14) : 1749-1770.

19. Bashandy S. Effect of Fixed Oil of *Nigella Sativa* on Male Fertility in Normal and Hyperlipidemic Rats.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه آقای مهدی آزادپور برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست سلولی تکوینی از دانشکده علوم پایه دانشگاه اراک بود و با حمایت مالی حوزه معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک به انجام رسیده است. در ضمن از کمک‌های ارزشمند خانم نادری و همچنین آقای مهدی نوده فراهانی در این مطالعه صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Neha P, Ramte jJ, Verma. Qurcetin Alleviates Bisphenol A-Induced Changes in Nucleic acid and Protein Contents in mice. *Acta poloniae Pharmaceutica- Drug Research.* 2011; 6: 867-873.

2. Kenichi K, Muneyuki M, Rui-Sheng W, et al. Effects of in Utero and Lactational Exposure to Bisphenol A on Somatic Growth and Anogenital Distance in F1 Rat Offspring. *Industrial Health.* 2002; 40: 375-381.

3. Murmu S, Shrivastava VK. Protective Action of an Anti-oxidant (Vitamin-C) Against Bisphenol-toxicity in *Cirrhinus mrigala* (Ham.). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 2011; 11: 25-29.

4. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses *Endocr Rev.* 2012; 33(3): 378-455.

5. Welshons WV, Nagel SC, Vom Saal FS. Large effects from small exposures. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure *Endocrine. suppl.* 2006; 6 :56-69.

6. Okada A, Kai O. Effect of estradiol – 17 beta and bisphenol A administered chronically to mice through pregnancy and lactation on the male pup's reproductive system. *Asian Journ of Andrology.* 2008; 4: 271-276.

7. Toyama Y, Yuassa S. Effects of neonatal administration of 17 beta estradiol, beta estradiol 3 benzoate or BPA on mouse and rat spermatogenesis. *Reprod Toxicol.* 2004; 2: 181-188.

8. Markey CM, Luque EH, Munoz DM, Sonnenschein C, et al. In utero exposure to bisphenol

- International Journal of Pharmacology. 2007; 3(1): 27-33.
20. Mohammad MA, Mohamad M, Dradka H. Effects of Black Seeds (*Nigella Sativa*) on Spermatogenesis and Fertility of Male Albino Rats. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*. 2009; 4(2): 386-390.
21. Tawfeek FKH, Ahmed SM, Kakel SJ. Effect of *Nigella sativa* Oil Treatment on the Sex organs and Sperm Charactors in Rats Exposed to Hydrogen Peroxide. *Mesopotamia J. of Agric*. 2006; 34(1):1-7.
22. Takahashi O, Oishi S. Testicular toxicity of dietarily or parenterally administered bisphenol A in rats and mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2003; 41(7): 1035-1044.
23. Begum NA, Dewan ZF, Nafar N, Mamun MI. Effect of n-Hexane extract of *nigella sativa* on gentamicin induced nephrotoxicity in rat . *Bangladesh J pharmacol*. 2006; 1: 16-20.
24. Kluin P, Kramer M, de Rooij D. Spermatogenesis in the Immature Mouse Proceeds Faster Than in the Adult. *Int J Androl*. 1982; 5(3): 282-294.
25. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc*. 2003; 75(4): 469-486.
26. Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol Pathol*. 2002; 30(4): 524-533.
27. Mouton PR. Principles and practices of unbiased stereology: an introduction for bioscientists. Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 2002: 103-105.
28. Soleimani Mehranjani M, Noorafshan A, Momeni HR, Abnosi MH, et al. Stereological study of the effects of vitamin E on testis structure in rats treated with paranonylphenol. *Asian J Androl*. 2009; 11(4): 508-516.
29. Dalgaard M, Pilegaard K, Ladefoged O. In utero exposure to diethylstilboestrol or 4-n-nonylphenol in rats: number of sertoli cells, diameter and length of seminiferous tubules estimated by stereological methods. *Pharmacol Toxicol*. 2002; 90(2): 59-65.
30. Ferrando RE, Nyengaard JR, Hays SR, Fahy JV, et al. Applying stereology to measure thickness of the basement membrane zone in bronchial biopsy specimens. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 112(6): 1243-1245.
31. Peng B, Zhang RD, Dai XS, Deng XZ, et al. Quantitative (stereological) study of the effects of vasectomy on spermatogenesis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Reproduction*. 2002; 124(6): 847-56.
32. Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. 2003; 185: 119-127.
33. Elshaari FA, Fatum AE, Sheriff DS. Spermatozoa-an unique representation of Oxygen-Antioxidant paradox. *Acta Medica Medianae*. 2010; 49(1): 48-53
34. Atsushi Ok, Osamu K. Effects of estradiol- and bisphenol A administered chronically to mice throughout pregnancy and lactation on the male pups' reproductive system. *Asian Journal of Andrology*. 2008; 10: 271-276.
35. Tan B, Kassim N, Mohd M. Assessment of Pubertal Development in Juvenile Male Rats after Sub-Acute Exposure to Bisphenol a and Nonylphenol. *Toxicology Letters*. 2003; 143(3): 261-270.
36. Gurmeet K, Rosnah I, Normadiah MK, Das S, et al. Detrimental Effects of Bisphenol A on Development and Functions of The Male Reproductive System in Experimental Rats. *EXCLI Journal*. 2014; 13: 151-160.
37. Jin P, Wang X, Chang F. Low dose bisphenol A impairs spermatogenesis by suppressing reproductive hormone production and promoting germ cell apoptosis in adult rats. *Journal of Biomedical Research*. 2012; 27(2): 135-144.
38. Sharma P, Kalita JC. Estrogenic Effects of Bisphenol-A and Octylphenol on Reproductive Health of Male Albino mice. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. 2013; 4(1): 188-194.
39. Anahara R, Yoshida M, Toyama Y, Maekawa M, et al. Estrogen agonists, 17 beta-estradiol, Bisphenol A, and diethylstilbestrol decrease cortactin expression in the mouse testis. *Arch. Histol. Cytol*. 2006; 69(2): 101-107.

40. Paulsson M. Basement membrane proteins: Structure, assembly and cellular interactions. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1992; 27(1-2): 93-127.
41. Takahashi O, Oishi S. Testicular toxicity of dietarily 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol A) in F344 rats. *Developmental toxicology.* 2001;75(1): 42-51.
42. Wetherill Y, Akingbemi B, Kanno J, McLachlan J. In Vitromolecular Mechanisms of Bisphenol a Action. *Reproductive Toxicology.* 2007; 24(2): 178-198.
43. Hughes PJ, McLellan H, Lowes DA, Kahn SZ, et al. Estrogenic alkylphenols induce cell death by inhibiting testis endoplasmic reticulum Ca(2p) pumps. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 277: 568-574.
44. Iida H, Maehara K, Doiguchi M, Mori T, et al. Bisphenol A induced apoptosis of cultured rat Sertoli cells. *Reprod. Toxicol.* 2003; 17: 457-464.
45. Boekelheide K, Fleming SL, Johnson KJ, Patel SR, et al. Role of Sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000; 225: 105-115.
46. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res.* 2000; 14(5): 323-328.

Protective Effect of *Nigella sativa* Oil on the Bisphenol a Induced-Testicular Toxicity in Adult Mice (NMRI): A Stereological Study

Soleimani Mehranjani M, Ph.D.^{1*}, Shariatzadeh SMA, Ph.D.¹, Azadpour M, M.Sc. Student²

1. Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran
2. M.Sc. in Animal physiology, Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

* Email corresponding author: m-soleimani@araku.ac.ir

Received: 19 Dec. 2014

Accepted: 17 Feb. 2015

Abstract

Aim: The aim of this study was to investigate the protective effect of *Nigella sativa* oil (NSO), as an antioxidant, on the testicular tissue in mice treated with bisphenol A.

Material and Methods: In this study, 24 adult male mice NMRI were divided into four groups (n=6): control, bisphenol A (200 mg/kg/day), *nigella sativa* oil (5 ml/kg/day) and bisphenol A + *nigella sativa* oil. 34 days after oral treatment, the right testis was taken out, fixed and processed followed by Heidenhain's Azan staining. The morphometric parameters of the testicular tissue were evaluated using stereological methods.

Results: The mean volume of seminiferous tubules and its height of the germinal epithelium, the mean diameter and thickness of the basement membrane, the mean number of spermatocytes, round and long spermatids, spermatogonia and Sertoli cells significantly reduced in the bisphenol A group compared to the controls ($P < 0.05$). The mean volume of seminiferous tubules and the mean number of Sertoli cells significantly increased in the bisphenol A + *nigella sativa* oil group to the control level. The mean number of spermatocytes and round and long spermatids also showed a significant increase in this group compared to the bisphenol A group ($P < 0.05$).

Conclusion: Co-administration of *nigella sativa* oil with bisphenol A can prevent the adverse effects of bisphenol A on the testicular tissue in adult mice.

Keywords: Stereology, Bisphenol A, Testes, *Nigella sativa* oil