Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:10 +0330 on Saturday November 18th 2017

Arak Medical University Journal (AMUJ)
2015; 17(93): 47-55

Original Article

Evaluation of the effect of Nigella *sativa* oil on sperm parameters in adult NMRI mice treated with Bisphenol A

Shariatzadeh MA[1], Hajian Karahroodi A[1*]

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

Received: 8 Oct 2014, Accepted: 26 Nov 2014

Abstract

Background: Bisphenol A (BPA) has estrogenic properties and generates reactive oxygen species (**ROS**). The aim of this study is to investigate the effect of Nigella sativa oil (NSO) on sperm parameters against toxicity induced with BPA.

Materials and Methods: In this experimental study, adult male mice with mean body weight 32±3 g were randomly divided into 4 groups (n=6): Control, BPA (200mg/kg/day), NSO (5ml/kg/day), and BPA+NSO. Oral treatment was performed till 34 days. After end of treatment, body and left testis weight were recorded and left caudal epididymis was also cut. Released spermatozoa were used to analyze sperm parameters such as motility, viability and abnormalities. Sperm chromatin quality was assessed. Data were analyzed with One-Way ANOVA.

Results: Body and testis weight showed no significant change in four groups ($p<0.05$). A significant decrease in the motility, viability and normal morphology of sperm ($p<0.001$) was found in BPA-treated mice compared to the control group. In BPA+ NSO group, NSO could significantly increas the mentioned parameters compared to the BPA group($p<0.05$). BPA had no effect on the uncleus diameter of the spetmatogonia and sperm DNA integrity and histon-protamine replacement.

Conclusion: The results indicated that NSO could partially ameliorate Bisphenol A-induced toxicity on sperm parameters.

Keywords: Bisphenol A, Mice, Nigella sativa oil, Spermatozoa

*Corresponding Author:
Address: Department of Biology, Arak University, Arak, Iran.
Email: hajian.a69@gmail.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:10 +0330 on Saturday November 18th 2017

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۷، شماره۱۲ (شماره پیاپی۹۳)،اسفند ۱۳۹۳، ۵۵-۴۷

ارزیابی اثر روغن سیاه‌دانه بر پارامترهای اسپرم موش‌های بالغ نژاد NMRI تیمار شده با بیس‌فنول‌آ

محمد علی شریعت زاده[1]، افسانه حاجیان کرهرودی[2*]

۱- استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۵

چکیده

زمینه و هدف: بیس‌فنول‌آ خاصیت استروژنی دارد و باعث تولید گونه‌های اکسیژن فعال می‌گردد. هدف از این مطالعه بررسی اثر روغن سیاه‌دانه بر پارامترهای اسپرم در برابر سمیت القا شده با بیس فنول آ بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی موش‌های نر بالغ با میانگین وزنی ۳±۳۲ گرم به طور تصادفی به ۴ گروه شش تایی تفسیم شدند که شامل کنترل، گروه بیس فنول آ (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه)، گروه روغن سیاه دانه (۵ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه) و گروه بیس فنول آ+ روغن سیاه دانه بود و به مدت ۳۴ روز به صورت دهانی تیمار شدند. بعد از اتمام دوره تیمار، وزن بدن و بیضه چپ ثبت گردید و ناحیه دمی اپیدیدیم چپ نیز قطعه‌قطعه شد. اسپرم‌ها به منظور بررسی پارامترهای اسپرمی از جمله تحرک، قابلیت حیات و ناهنجاری‌های‌اسپرم مورد استفاده قرار گرفت. کیفیت کروماتین اسپرم، بررسی گردید. داده‌ها با روش آماری آنووا تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌ها: وزن بدن و بیضه در ۴ گروه تغییر معنی‌داری نداشت($p<۰/۰۵$). کاهش معنی‌داری در تحرک، قابلیت حیات و شکل طبیعی اسپرم($p<۰/۰۰۱$) در گروه بیس فنول آ در مقایسه با کنترل دیده شد. در گروه چهارم، روغن سیاه دانه توانست به طور معنی‌داری پارامترهای ذکر شده را نسبت به گروه بیس فنول آ افزایش دهد($p<۰/۰۵$). بیس فنول آ تاثیری روی قطر هسته اسپرماتوگونی و تمامیت DNA اسپرم و جایگزینی پروتامین به جای هیستون نداشت.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که روغن سیاه دانه توانست سمیت القا شده توسط بیس فنول آ بر روی پارمترهای اسپرم را تا حدودی بهبود ببخشد.

واژگان کلیدی: بیس‌فنول‌آ، اسپرماتوزوآ، روغن سیاه دانه، موش

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

Email:hajian.a69@gmail.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:10 +0330 on Saturday November 18th 2017

مقدمه

ناباروری یکی از مشکلات عمده در بین زوج‌های جوان است و به طور عمده از هر ۶ زوج، یک زوج دچار نقص در باروری می‌گردد. عواملی مانند ژنتیک، شغل و عوامل محیطی می‌توانند در باروری اختلال ایجاد کنند(۱). مواجهه مکرر با مواد شیمیایی خاص و سموم موجب ایجاد نقص در روند طبیعی باروری می‌شود. در این بین استروژن‌های خارجی به عنوان مخرب سیستم غدد درون ریز شناسایی شده‌اند که می‌توانند در فرآیند اسپرماتوژنز اختلال ایجاد کنند(۲). از طرفی یکی از عوامل شایعی که در ناباروری نقش دارد استرس اکسیداتیو ناشی از آلاینده‌های زیست محیطی است(۳). بیس‌فنول‌آ یکی از منومرهای صنعتی است که در اکثر فرم‌های پلاستیک‌های پلی‌کربنه کاربرد دارد و هم‌چنین در تولید اپوکسی رزین مورد استفاده در لاک محافظ داخل قوطی‌های فلزی موادغذایی، به کار می‌رود(۴). این ترکیب صنعتی علاوه بر غذا می‌تواند توسط جریان‌های فاضلابی، آب‌های جاری روی زمین و پسماندهای پلی‌کربنات و رزین به انسان منتقل شود(۵). بیس‌فنول‌آ به طور مستقیم بر روی سلول‌های لیدیگ اثر می‌گذارد و به صورت آنتاگونیست روی گیرنده‌های آندروژن وارد عمل می‌شود، در نتیجه در فعالیت آندروژن اختلال ایجاد می‌کند و در نهایت بر هورمون‌های جنسی، بیضه، اپیدیدیم، کیسه‌های منی، غده پروستات و اسپرم و تولید آن اثر می‌گذارد(۶، ۷). کاهش در سطح آندروژن نیز خود باعث کاهش در تعداد سلول‌های لیدیگ می‌گردد و از میوز اسپرماتوسیت‌ها جلوگیری می‌کند(۸، ۹). بیس‌فنول‌آ هم‌چنین موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مثل سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون شده و باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و آسیب بافتی در بیضه می‌شود. افزایش استرس اکسیداتیو در بیضه لیپید پراکسیداسیون غشا را نیز به دنبال خواهد داشت(۱۰، ۱۱).

روغن سیاه‌دانه شامل تیموکینون(TQ)، دی‌تیموکینون (DTQ)، تیموهیدروکینون (DTQ) و تیمول (THY) است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند(۱۲). سیاه‌دانه به عنوان آنتی‌اکسیدان روی بیضه، غدد ضمیمه، اپیدیدیم و اسپرم اثر می‌گذارد و از آسیب رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند(۱۳، ۱۴). اسیدهای چرب غیراشباع در روغن سیاه‌دانه فعالیت آنزیم β-هیدروکسی استروئید دهیدروژناز را تحریک می‌کند. این آنزیم، در مسیر سنتز تستوسترون نقش دارد(۱۵). با توجه به این که بیس‌فنول‌آ بر دستگاه تولیدمثلی نر اثر مخرب دارد و روغن سیاه‌دانه به عنوان آنتی اکسیدان عمل می‌کند، برآن شدیم که اثر هم‌زمان روغن سیاه‌دانه و بیس‌فنول‌آ را بر فاکتورهای اسپرم موش بالغ بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها

برای انجام این مطالعه تجربی، از موش‌های نر بالغ نژاد NMRI که از انیستیتو پاستور ایران خریداری شده بودند و در خانه حیوانات دانشگاه اراک در شرایط استاندارد(دمای۲±۲۱ درجه سانتی‌گراد و نور محیطی با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ساعت روشنایی) با دسترسی آسان به آب و غذا نگهداری می‌شدند، استفاده شد. سپس موش‌ها به ۴ گروه تقسیم شدند که در هر گروه شش سر موش وجود داشت که شامل گروه کنترل، گروه روغن سیاه‌دانه (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم از جهاد دانشگاهی کرج)، گروه بیس‌فنول‌آ (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه از آلوریچ- سیگما) و گروه روغن سیاه‌دانه + بیس‌فنول‌آ بود. تیمارها به صورت دهانی به وسیله گاوژ در طی ۳۴ روز صورت‌گرفت.

وزن بدن و بیضه: در پایان دوره تیمار، حیوان‌ها وزن، به وسیله اتر بی‌هوش و سرانجام کشته شدند. پس از خروج بیضه چپ، این اندام از چربی تمیز و وزن آن ثبت گردید. تمامی اصول بهداشتی در نگهداری و معدوم‌سازی حیوانات بر اساس پروتکل کمیته اخلاق پزشکی مصوب ۲۸/۵/۱۳۸۵ (مطابق با پروتکل هلسینکی ۱۹۷۵) در این پژوهش رعایت شد. سپس ناحیه دمی اپی دیدیم چپ جدا شد تا جهت آنالیزهای اسپرم که در زیر به آن اشاره شده است مورد استفاده قرار گیرد.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:10 +0330 on Saturday November 18th 2017

قابلیت حیات اسپرم: جهت سنجش قابلیت حیات اسپرم، بر اساس دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت رنگ آمیزی ائوزین- نکروزین صورت گرفت(۱۶). به طور خلاصه، ائوزین ۱ درصد و نکروزین ۱۰ درصد در نرمال سالین آماده شد. نسبت یک حجم سوسپانسیون اسپرم و دو حجم ائوزین را در اپندورف مخلوط کرده و پس از ۳۰ ثانیه نگهداری در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حجم مساوی از محلول نکروزین به آن اضافه و گسترش نازکی از نمونه بر روی لام ایجاد گردید. پس از خشک شدن گسترش، با استفاده از میکروسکوپ معمولی با عدسی ۱۰۰× تعداد ۱۰۰ اسپرم شمارش شد و نسبت درصد اسپرم در گروه‌های مختلف محاسبه گردید. در این رنگ آمیزی سر اسپرم‌های زنده سفید در حالی که سر اسپرم‌های مرده قرمز رنگ شد.

ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم: به منظور بررسی مورفولوژی اسپرم، لام‌های ائوزین- نکروزین تهیه شده برای بررسی قابلیت حیات اسپرم مورد استفاده قرار گرفت. برای هر نمونه ۲۰۰ اسپرم با بزرگنمایی ۱۰۰× میکروسکوپ نوری بررسی و میزان ناهنجاری‌ها به صورت درصد بیان شد.

قابلیت تحرک اسپرم: سنجش حرکت اسپرم بر اساس دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت انجام شد(۱۶). 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 با بزرگنمایی۲۰× مورد بررسی قرار گرفت. حداقل ۵ میدان دید میکروسکوپ برای تعیین قابلیت تحرک ۲۰۰ اسپرم برای هر موش بررسی و درصد اسپرم‌های دارای حرکات پیشرونده، حرکات درجا و بدون حرکت محاسبه گردید.

کیفیت کروماتین اسپرم: در این بررسی ۱۰ میکرولیتر از نمونه بر روی لام قرار داده شد و یک گسترش از نمونه تهیه گردید. پس از خشک شدن گسترش‌ها در هوا، لام در محلول فیکساتیو متانول-اسید استیک گلاسیال (به نسبت ۳ به ۱) به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. با قرار دادن لام‌ها در محلول رنگ کاری، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. لام‌های رنگ گرفته به مدت ۵ دقیقه با آب جاری شستشو داده شدند. با استفاده از یک قطره محلول بافر فسفات حاوی گلیسرول لامل گذاری صورت گرفت. با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس توسط فیلتر ۴۵۰ نانومتر و با استفاده از عدسی ابژکتیو ۱۰۰× در هر اسلاید ۱۰۰ عدد اسپرم مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم‌ها با توجه به میزان رنگ‌پذیری در سه گروه شامل: اسپرم‌های سبز رنگ (با DNA طبیعی)، اسپرم‌های زرد رنگ (حالت حدواسط) و اسپرم‌های قرمز رنگ (با DNA دناتوره تک رشته‌ای) بررسی شدند.

نمونه کنترل مثبت: به منظور کنترل روش مذکور از نمونه‌های کنترل مثبت استفاده شد. بدین منظور نمونه‌های اسپرم از حیوان سالم و بالغ گرفته شد و سپس DNA این اسپرم‌ها تحت تاثیر حرارت بالا (۹۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت۳۰ دقیقه دناتوره شد و پس از تهیه گسترش، نمونه‌ها به روش اشاره شده در فوق رنگ‌آمیزی شدند.

جهت تعیین میزان جایگزینی پروتامین به جای هیستون، گسترش‌های اسپرم با آنیلین بلو رنگ آمیزی شدند. به طور خلاصه گسترش‌های اسپرم به وسیله محلول فرمالین۴ درصد برای ۵ دقیقه تثبیت و پس از شستشو با آب مقطر، لام‌ها با آنیلین بلو (آنیلین بلو ۵ درصد در اسید استیک ۴ درصد و pH= ۳/۵) رنگ آمیزی گردید. سپس لام‌ها برای ۵ دقیقه در آب مقطر شستشو و سرانجام با محلول ائوزین ۰/۵ درصد برای یک دقیقه رنگ آمیزی شدند. پس از خشک شدن، لام‌ها توسط میکروسکوپ معمولی با بزرگنمایی ۱۰۰× مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این روش سر اسپرم‌های نابالغ (واجد مقادیر زیاد هیستون) به صورت آبی پررنگ، در حالی که اسپرم‌های بالغ (واجد پروتامین) به رنگ قرمز-صورتی ظاهر می‌شوند. حداقل ۱۰۰ اسپرم در هر لام شمارش تا درصد اسپرم‌های بالغ و نابالغ تعیین گردد.

نمونه کنترل مثبت: به منظور کنترل روش مذکور از نمونه‌های کنترل مثبت استفاده شد. بدین منظور بیضه‌های موش نابالغ در محیط کشت قطعه‌قطعه شد و از

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:10 +0330 on Saturday November 18th 2017

سوسپانسیون محیط کشت گسترش‌هایی‌تهیه گردید و به روش اشاره شده در فوق رنگ‌آمیزی شد.

در پایان داده‌های حاصل توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA One way) و تست توکی (Tukey's test) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و سطح معنی داری نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

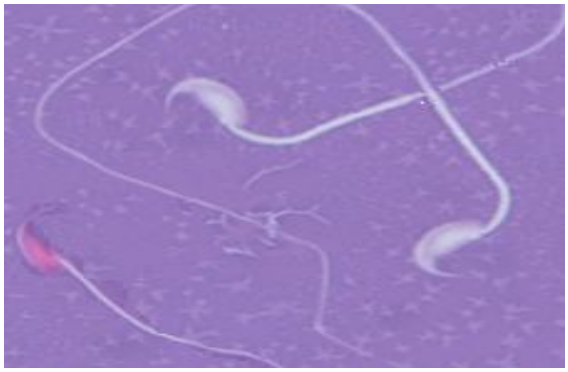
وزن بدن و بیضه: بعد از دوره ۳۴ روزه تیمار در هیچ یک از گروه‌ها نسبت به کنترل اختلاف معنی‌داری در میانگین وزن بدن و بیضه موش مشاهده نشد($p<۰/۰۵$)(جدول ۱).

جدول ۱. مقایسه میانگین وزن بدن و بیضه موش (گرم) در گروه‌های مختلف، ۳۴ روز پس از تیمار با بیس‌فنولآ و روغن سیاه‌دانه

وزن	کنترل	بیس فنول آ	بیسفنول آ+سیاه دانه	سیاه دانه
وزن موش در پایان دوره تیمار (گرم)	۳۴/۶۳±۰/۹۳[a]	۳۴/۳۳±۳/۰۵[a]	۳۴/۵۳±۶/۷۷[a]	۳۳/۶۳±۲/۵۴[a]
وزن بیضه (گرم)	۰/۱۱±۰/۰۱[a]	۰/۱۰±۰/۰۱ [a]	۰/۱۲±۰/۰۱ [a]	۰/۱۱±۰/۰۱ [a]

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار می باشد.

قابلیت حیات اسپرم: اسپرم‌های زنده که مطابق با قابلیت حیات اسپرم است، در گروه تیمار شده با بیس‌فنولآ در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت($p<۰/۰۰۱$). بررسی‌ها قابلیت حیات اسپرم در گروه بیس‌فنولآ + روغن سیاه‌دانه در مقایسه با گروه بیس‌فنولآ افزایش معنی‌داری($p<۰/۰۵$) را نشان داد. به عبارت دیگر در گروه بیس‌فنولآ + روغن سیاه‌دانه، روغن سیاه‌دانه توانست اثرات مخرب بیس‌فنولآ را در خصوص قابلیت حیات اسپرم در مقایسه با گروه بیس‌فنولآ جبران نماید از طرفی در این گروه نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. گروهی که روغن سیاه‌دانه دریافت کردند قابلیت حیات اسپرم آنها افزایش معنی‌داری را نشان نمی‌دهد(جدول ۲ و شکل ۱).



شکل ۱. ارزیابی قابلیت حیات اسپرم‌های موش: a) اسپرم‌های سفید بیانگر اسپرم‌های زنده. b) اسپرم‌های قرمز بیانگر اسپرم مرده می‌باشند. رنگ آمیزی ائوزین-نکروزین، بزرگنمایی ۱۰۰×

ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم: در گروهی که بیس‌فنولآ دریافت کردند درصد اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافت($p<۰/۰۰۱$) ولی در گروه بیس‌فنولآ + روغن سیاه‌دانه، روغن سیاه‌دانه توانست اثر بیس‌فنولآ را در مقایسه با گروه بیس‌فنولآ به طور معنی‌داری جبران نماید و میزان آن را به سطح کنترل برساند($p<۰/۰۵$). روغن سیاه‌دانه به تنهایی موجب افزایش معنی‌دار درصد اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی نسبت به گروه کنترل شد($p<۰/۰۵$)(جدول ۲).

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:10 +0330 on Saturday November 18th 2017

ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم در گروه بیس‌فنول‌آ شامل سر موزی‌شکل، سر باریک، سر گلابی‌شکل، قطرات سیتوپلاسمی و برخی ناهنجاری‌های دیگر می‌باشند.

جدول ۲: مقایسه میانگین پارامترهای‌اسپرمی (قابلیت حیات و مورفولوژی طبیعی اسپرم) در گروه‌های مختلف، ۳۴ روز پس از تیمار با بیس‌فنول‌آ و روغن سیاه‌دانه

گروه ها	مورفولوژی طبیعی اسپرم (درصد)	قابلیت حیات اسپرم (درصد)
کنترل	۹۷/۷۱±۰/۶۳[a]	۶۶/۰۰±۳/۱۵
بیس فنول آ	۹۶/۳۴±۰/۱۹[c]	۴۶/۱۸±۴/۷۲
بیس فنول آ+ سیاه دانه	۹۷/۶۸±۰/۴۳[a]	۵۸/۱۲±۳/۲۰
سیاه دانه	۹۸/۴۷±۰/۳۰[b]	۶۷/۴۵±۸/۲۶

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار می باشد.

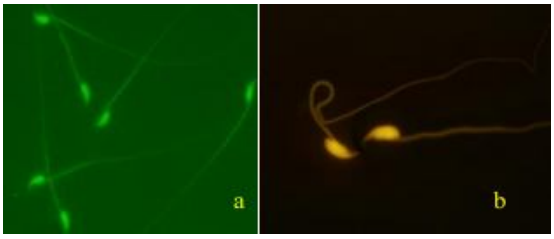
قابلیت تحرک اسپرم: تعداد اسپرم‌های جلورونده در گروهی که بیس‌فنول‌آ دریافت کردند نسبت به کنترل به صورت معنی‌داری کاهش یافته است($p<۰/۰۰۱$). در گروه سیاه‌دانه میانگین اسپرم‌های جلورونده نسبت به کنترل افزایش یافته است اما این اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد. بررسی در گروه بیس‌فنول‌آ + سیاه‌دانه نشان داده که تعداد اسپرم‌های جلورونده نسبت به گروه کنترل کاهش یافته ولی تا حدی سیاه‌دانه توانسته کاهش اسپرم‌های جلورونده توسط بیس فنول‌آ را جبران کند($p<۰/۰۵$)(جدول۳). در گروه بیس‌فنول‌آ میانگین تعداد اسپرم‌های درجا نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است($p< ۰/۰۰۱$). در گروهی که سیاه‌دانه دریافت کردند تعداد اسپرم‌های درجا نسبت به کنترل کاهش داشت اما این کاهش معنی‌دار نبود. در گروه سم + عصاره تعداد اسپرم‌های درجا نسبت به کنترل افزایش داشت اما این افزایش نتوانسته اثر سمیت بیس‌فنول‌آ را جبران کند($p<۰/۰۵$). تعداد اسپرم‌های ساکن در گروهی که بیس‌فنول‌آ دریافت کردند نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشته است($p<۰/۰۰۱$)، در حالی که تعداد اسپرم‌های ساکن در گروه سیاه‌دانه کاهش معنی‌داری نسبت به کنترل نداشت. در گروه بیس‌فنول‌آ + سیاه‌دانه نسبت به گروه بیس‌فنول‌آ تعداد اسپرم‌های ساکن کاهش معنی‌داری پیدا کرده ولی سیاه‌دانه نتوانسته تمام اثر بیس‌فنول‌آ را خنثی کند و تعداد اسپرم‌های ساکن را به حد کنترل رساند($p<۰/۰۵$)(جدول۳).

جدول ۳. مقایسه میانگین قابلیت تحرک اسپرم در گروه‌های مختلف، ۳۴ روز پس از تیمار با بیس‌فنول‌آ و روغن سیاه‌دانه

گروه ها	قابلیت تحرک اسپرم (درصد)		
	جلورونده	درجا	ساکن
کنترل	۷۱/۴۲±۱/۶۹[a]	۷/۴۱±۰/۹۰[a]	۲۰/۸۱±۱/۰۷[a]
بیس فنول آ	۳۳/۸۴±۵/۹۱[b]	۲۹/۵۵±۳/۴۱[b]	۳۶/۵۳±۴/۴۶[b]
بیس فنول آ+ سیاه دانه	۵۸/۳۵±۲/۱۴[c]	۱۵/۸۰±۱/۰۵[c]	۲۵/۸۲±۲/۶۳[c]
سیاه دانه	۷۵/۲۸±۱/۵۴[a]	۶/۱۱±۱/۴۱[a]	۱۸/۶۰±۱/۱۱[a]

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار می باشد.

تمامیت DNA اسپرم: رنگ آمیزی گسترش‌های اسپرمی با اکرینین اورنج مشخص می‌کند که تیمار موش‌ها با بیس‌فنول‌آ در مقایسه با گروه کنترل تاثیری روی دناتوره شدن ساختمان دورشته‌ای DNA اسپرم نداشت(شکل۲).



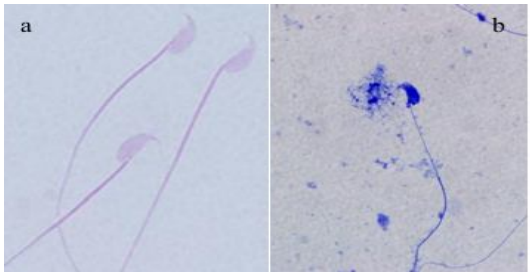
شکل ۲. ارزیابی تمامیت DNAاسپرم‌های موش. a) اسپرم‌ها با سر سبز رنگ نشان دهنده DNA طبیعی و دست نخورده در گروه تیمار شده با بیس‌فنول‌آ می‌باشد. b) نمونه کنترل مثبت اسپرم‌های با سر نارنجی بیان‌گر اسپرم‌هایی است که DNA آنها توسط حرارت بالا دناتوره شده است. رنگ آمیزی آکریدین اورنج، بزرگنمایی ۱۰۰

ارزیابی جایگزینی پروتامین به جای هیستون

بررسی با رنگ‌آمیزی گسترش‌های اسپرمی با آنیلین بلو نشان داد موش‌هایی که بیس‌فنول‌آ دریافت کرده بودند در مقایسه با کنترل، تاثیری بر روی جایگزینی هیستون

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:10 +0330 on Saturday November 18th 2017

با پروتامین در هسته طی فرایند بلوغ اسپرم مشاهده نشد. برعکس، نمونه‌های کنترل مثبت که از حیوان نابالغ (حاوی مقدار زیادی پروتئین هیستون) گرفته شده بود به رنگ آبی ظاهر شدند(شکل ۳).



شکل ۳. ارزیابی جایگزینی پروتامین به جای هیستون در کروماتین اسپرم موش a) اسپرم‌های با سر قرمز- صورتی (red-pink) بیان‌گر اسپرم‌های بالغ واجد پروتامین هسته‌ای در گروه تیمار شده با بیس‌فنولآ می‌باشد. b) نمونه‌های کنترل مثبت شامل اسپرم‌های گرفته شده از حیوان نابالغ که سر اسپرم به دلیل وجود هیستون زیاد در کروماتین، به رنگ آبی دیده می‌شود.

بحث

قابلیت تحرک و قابلیت حیات اسپرم به عنوان مهم‌ترین پارامترهای اسپرم برای سنجش توانایی لقاح و هم‌چنین تمامیت غشا اسپرم محسوب می‌شوند(۲۰-۱۷). در مطالعه حاضر بیس‌فنولآ درصد اسپرم‌های زنده یا قابلیت حیات اسپرم را نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌دار کاهش داد و نیز در گروه بیس‌فنولآ نسبت به گروه کنترل حرکات جلورونده اسپرم کاهش معنی‌دار و از طرفی حرکات ساکن و درجا اسپرم افزایش معنی‌داری یافت. علاوه بر آن تاثیر هم‌زمان بیس‌فنولآ + روغن سیاه‌دانه توانست این اثرات را در مقایسه با گروه بیس‌فنولآ به طور معنی‌داری جبران نماید. رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایجاد شده توسط بیس‌فنولآ باعث لیپیدپراکسیداسیون می‌شود که با برهم زدن حالت فیزیولوژیک مرگ اسپرم‌ها را به دنبال دارد(۲۱). یکی از مکانیسم‌هایی که بیس‌فنولآ به وسیله آن می‌تواند موجب این اثر شود آن است که بیس‌فنولآ می‌تواند با ایجاد استرس اکسیداتیو نقش مهمی در سیالیت غشا داشته باشد. اسیدهای چرب غیر اشباع غشا حساس به آسیب اکسیژنی‌اند و در نهایت پراکسیداسیون لیپیدی باعث کاهش تحرک اسپرم می‌شود. به همراه پراکسیداسیون لیپیدی کاهش سریع ATP داخل سلولی رخ می‌دهد و منجر به کاهش فسفوریلاسیون پروتئین axonemal (ناحیه میانی در اسپرم که میتوکندری در آن قرار دارد) می‌گردد و در نتیجه باعث بی تحرکی اسپرم می‌شود(۲۲). فرضیه دیگر این است که H2O2 از عرض غشاء به داخل سلول انتشار می‌یابد و فعالیت بعضی آنزیم‌ها مثل گلوکز-6 - فسفات-دهیدروژناز (G6PD) را مهار می‌کند، مهار G6PD منجر به کاهش NADPH و تجمع گلوتاتیون اکسیده می‌شود که می‌تواند دفاع آنتی‌اکسیدانی اسپرماتوزوآ را کاهش و پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشاء را افزایش دهد(۲۳). از آنجا که روغن سیاه‌دانه در گروه بیس‌فنولآ + روغن سیاه‌دانه توانست تاثیر مخرب بیس‌فنولآ را بر روی حرکت اسپرم جبران نماید، احتمال کاهش حرکت اسپرم در حیوانات مورد تاثیر با بیس‌فنولآ و این که استرس اکسیداتیو عاملی برای آن باشد، وجود دارد. در این مطالعه مشاهده شد که روغن سیاه‌دانه در گروه بیس‌فنولآ+ روغن سیاه‌دانه، توانست قابلیت حیات اسپرم‌ها را در مقایسه باگروه بیس‌فنولآ به طور معنی‌داری جبران نماید. نتایج ما هم‌چنین نشان داد که روغن سیاه‌دانه به تنهایی قادر است قابلیت حیات اسپرم‌های اپیدیدیمی را در مقایسه با گروه کنترل افزایش دهد که احتمالا نشان دهنده نقش مثبت روغن سیاه‌دانه در بقاء و قابلیت حیات اسپرم می‌باشد. در تائید این احتمال نقش روغن سیاه‌دانه در دستگاه تناسلی و بنابراین در تولیدمثل به وسیله کاهش پراکسیداسیون لیپیدی به اثبات رسیده است(۱۵، ۲۴). در این خصوص این احتمال وجود دارد که روغن سیاه‌دانه قادر است به عنوان یک آنتی اکسیدانت با مهار استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپید را در اسپرم کاهش داده و بدین ترتیب از مرگ اسپرم‌ها جلوگیری نماید و موجب افزایش قابلیت حیات اسپرم شود. هم‌چنین روغن سیاه‌دانه به عنوان یک آنتی اکسیدانت احتمالا با افزایش توان سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی موجب افزایش قابلیت حیات اسپرم شده است(۱۳، ۱۴).

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:10 +0330 on Saturday November 18th 2017

در بررسی مورفولوژی اسپرم‌ها، درصد مورفولوژی طبیعی اسپرم در گروه بیس‌فنول‌آ در مقایسه با کنترل کاهش معنی‌داری داشت. بیس‌فنول‌آ باتولید رادیکال آزاد اکسیژن می‌تواند باعث لیپید پراکسیدلسیون اپیتلیوم زایشی شود و در اسپرماتوژنز اختلال ایجاد کند و همین طور استرس اکسیداتیو ایجاد شده می‌تواند سیالیت غشا اسپرم و حالت طبیعی آن را از بین ببرد(۲۲، ۲۵). بیس‌فنول‌آ باعث کاهش هورمون تستوسترون می‌گردد. کاهش تستوسترون باعث اختلال در اسپرماتوژنز و اسپرمیوژنز می‌گردد(۲۵، ۲۶).

تیمار حیوان‌ها با بیس‌فنول‌آ طی۳۴روز نشان داد میانگین وزن موش‌ها در پایان دوره تیمار در گروه بیس‌فنول‌آ نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نداشته است. این نتیجه با نتایج برخی دیگر از مطالعات تطبیق دارد(۱۹-۱۷). از مقایسه وزن بیضه موش در گروه بیس‌فنول‌آ نسبت به گروه کنترل تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. در مطالعه تاکاهاشمی و همکاران نیز کاهش معنی‌داری در وزن بیضه نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. در برررسی دیگری نیز تغییر معنی‌داری در وزن بیضه مشاهده نشد(۱۸، ۲۰). بنابراین عدم کاهش وزن در مطالعه حاضر ممکن است ناشی از کافی نبودن مدت زمان تیمار، دوز مصرفی بیس‌فنول‌آ و هم‌چنین زمان تیمار(قبل یا بعد از بلوغ) باشد.

هم‌چنین در این بررسی با استفاده از رنگ آمیزی آکریدین اورنج و آنیلین بلو نشان داده شد که اسپرم‌های گرفته شده از موش‌های تیمار شده با بیس‌فنول‌آ در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی‌داری را به ترتیب روی دناتوره شدن ساختمان دو رشته‌ایDNA (تمامیت DNA) و جایگزین شدن پروتامین به جای هیستون(که در طی بلوغ اسپرم اتفاق می‌افتد) نشان نداد. تاکنون در هیچ مطالعه‌ای تاثیر بیس‌فنول‌آ بر روی تمامیت DNA و هم‌چنین جایگزینی پروتامین به جای هیستون گزارش نشده است.

نتیجه‌گیری

بیس‌فنول‌آ به عنوان یک آلاینده زیست محیطی احتمالا با القا استرس اکسیداتیو قادر است ناهنجاری‌هایی را در برخی از پارامترهای اسپرمی مانند قابلیت حیات، قابلیت تحرک اسپرم بوجود آورد و روغن سیاه‌دانه به عنوان یک آنتی اکسیدان قادراست اثرات مخرب این آلاینده را براین پارامترهای اسپرم محافظت نماید. بنابراین استفاده ازروغن سیاه‌دانه به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی می‌تواند استراتژی مناسبی برای کاهش رادیکال‌های آزاد و بنابراین جلوگیری از آسیب‌های وارده به سیستم تناسلی در افرادی که بیشتر در معرض آلاینده‌های زیست محیطی القاکننده استرس اکسیداتیو هستند، به شمار آید.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه خانم افسانه حاجیان کرهرودی با عنوان ارزیابی اثر روغن سیاه دانه بر پارامترهای اسپرم موش های نژاد NMRI تیمار شده با بیس فنول آ برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست سلولی تکوینی از دانشکده علوم پایه دانشگاه اراک می‌باشد. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند تا از خانم سمیرا نادری و همه آنهایی که ما را در این پژوهش به نوعی یاری دادند کمال تشکر و سپاسگزاری را داشته باشند.

منابع

1. Irvine DS. Epidemiology and aetiology of male infertility. Human Reproduction. 1998; 13(suppl 1):33-44.
2. Ten J, Mendiola J, Torres-Cantero AM, Moreno-Grau JM, Moreno-Grau S, Roca M, et al. Occupational and lifestyle exposures on male infertility: A mini review. Open Reproductive Science Journal. 2008;1:16-21.
3. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. 2009.
4. Muncke J, Environmental Hormones in Food Packaging. Migration into Food and the Environment .2009.
5. Crain DA, Eriksen M, Iguchi T, Jobling S, Laufer H, LeBlanc GA, et al. An ecological assessment of bisphenol-A: evidence from comparative biology. Reproductive Toxicology. 2007;24(2):225-39.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 4:10 +0330 on Saturday November 18th 2017

6. Li D, Zhou Z, Qing D, He Y, Wu T, Miao M, et al. Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction. Human Reproduction. 2009.
7. Gurmeet K, Rosnah I, Normadiah M, Das S, Mustafa A. Detrimental effects of bisphenol A on development and functions of the male reproductive system in experimental rats. 2014.
8. Ahn KC, Zhao B, Chen J, Cherednichenko G, Sanmarti E, Denison MS, et al. In vitro biologic activities of the antimicrobials triclocarban, its analogs, and triclosan in bioassay screens: receptor-based bioassay screens. Environ Health Perspect. 2008;116(9):1203-10.
9. Jin P, Wang X, Chang F, Bai Y, Li Y, Zhou R, et al. Low dose bisphenol A impairs spermatogenesis by suppressing reproductive hormone production and promoting germ cell apoptosis in adult rats. Journal of biomedical research. 2013;27(2):135-6.
10. Hassan ZK, Elobeid MA, Virk P, Omer SA, ElAmin M, Daghestani MH, et al. Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. Oxidative medicine and cellular longevity. 2012;2012.
11. Šutiaková I, Kovalkovičová N, Tulenková M, Šutiak V. Bisphenol A and its potential toxic effects on living organisms. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2012;2(2):526-35.
12. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the Nigella sativa L. seed. International immunopharmacology. 2005;5(13):1749-70.
13. Mohammad MA, Mohamad MM, 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):386-90.
14. Ghlissi Z, Hamden K, Saoudi M, Sahnoun Z, Mounir Zeghal K, El Fki A. Effect of Nigella sativa seeds on reproductive system of male diabetic rats. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2012;6(20):1444-50.
15. Bashandy AS. Effect of fixed oil of Nigella sativa on male fertility in normal and hyperlipidemic rats. Int J Pharmacol. 2007; 3(1):27-33.
16. WHO. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction: Cambridge university press; 1999.
17. Tan BL, Kassim NM, Mohd MA. Assessment of pubertal development in juvenile male rats after sub-acute exposure to bisphenol A and nonylphenol. Toxicology letters. 2003;143(3):261-70.
18. Takahashi O, Oishi S. Testicular toxicity of dietary 2, 2-bis (4-hydroxyphenyl) propane (bisphenol A) in F344 rats. Archives of toxicology. 2001;75(1):42-51.
19. Takahashi O, Oishi S. Testicular toxicity of dietarily or parenterally administered bisphenol A in rats and mice. Food and chemical toxicology. 2003;41(7):1035-44.
20. Nakamura D, Yanagiba Y, Duan Z, Ito Y, Okamura A, Asaeda N, et al. Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. Toxicology letters. 2010;194(1):16-25.
21. Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. Reprod Biol Endocrinol. 2004;2(12):1-7.
22. Bansal AK, Bilaspuri GS. Antioxidant effect of vitamin E on motility, viability and lipid peroxidation of cattle spermatozoa under oxidative stress. Animal Science Papers and Reports. 2009;27(1):5-14.
23. Agarwal A. Significance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility. Male fertility and lipid metabolism. 2003;13:157-83.
24. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. Phytotherapy Research. 2000(14):323-8.
25. Sharma P. Estrogenic Effects of Bisphenol A and Octylphenol on Reproductive Health of Male Albino mice. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive. 2013;4(1).
26. Herath CB, Jin W, Watanabe G, Arai K, Suzuki AK, Taya K. Adverse effects of environmental toxicants, octylphenol and bisphenol A, on male reproductive functions in pubertal rats. Endocrine. 2004;25(2):163-72.