

# نقش حفاظتی ویتامین E در جلوگیری از تغییرات نامطلوب بیسفنول A بر بافت بیضه موش صحرائی: یک ارزیابی استریولوژیک

ملک سلیمانی مهرانجانی<sup>۱\*</sup>، منیره محمودی<sup>۲</sup>، مرضیه امجدی<sup>۳</sup>

## مقاله پژوهشی

**مقدمه:** بیسفنول A به عنوان یک آلاینده زیست محیطی دارای اثرات استروژنی است و می‌تواند سبب القای استرس اکسیداتیو در بافت بیضه شود. هدف، بررسی نقش ویتامین E به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی بر اثرات نامطلوب بیسفنول A بر بافت بیضه موش‌های صحرائی بالغ بود.

**روش بررسی:** موش‌های صحرائی نر (۱۵±۲۲۰ گرم) به چهار گروه (n=۶): کنترل، بیسفنول A (۲۵۰ mg/kg/day)، ویتامین E (۱۵۰ mg/kg/day) + بیسفنول A و بیسفنول A تقسیم شدند و به صورت دهانی به مدت ۵۶ روز (۳ بار در هفته) تحت تیمار قرار گرفتند. در پایان، بیضه راست خارج شد و بعد از فیکس، برش‌گیری، پاساژ بافتی و رنگ آمیزی به روش هاپدن هاین آزان با استفاده از روش استریولوژیک مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان هورمون تستوسترون و مالون‌دی‌آلدهید (MDA) سرم خون نیز اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (version 16) و روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی تجزیه و تحلیل و تفاوت میانگین‌ها در سطح (p<۰/۰۵) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

**نتایج:** کاهش معنی‌داری در حجم کل بیضه، حجم و قطر لوله‌های منی‌ساز و ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی و ضخامت غشا پایه آن، تعداد اسپرماتیدها، اسپرماتوسیت‌ها، سلول‌های سرتولی، غلظت تستوسترون سرم و افزایش معنی‌داری در سطح مالون‌دی‌آلدهید سرم در گروه تیمار با بیسفنول A در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (p<۰/۰۵). پارامترهای فوق در گروه ویتامین E + بیسفنول A تا سطح گروه کنترل جبران شد (p<۰/۰۵).

**نتیجه‌گیری:** ویتامین E به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی، می‌تواند بسیاری از اثرات نامطلوب بیسفنول A را بر بافت بیضه جبران کند. بنابراین پیشنهاد می‌شود از آن به عنوان یک مکمل بالقوه در موارد مسمومیت با بیسفنول A استفاده شود.

**واژه‌های کلیدی:** بیسفنول A، ویتامین E، استریولوژی، بیضه، موش صحرائی

**ارجاع:** سلیمانی مهرانجانی ملک، محمودی منیره، امجدی. مرضیه نقش حفاظتی ویتامین E در جلوگیری از تغییرات نامطلوب بیسفنول A بر بافت بیضه موش صحرائی: یک ارزیابی استریولوژیک. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶ (۲): ۹۷-۱۱۰.

۱- استاد بافت شناسی و جنین شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

۲- استادیار علوم جانوری (گرایش سلولی-تکوینی)، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

۳- کارشناسی ارشد زیست تکوینی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۸۱۶۱۷۰۹۸، پست الکترونیکی: m-soleimani@araku.ac.ir

## مقدمه

بیسفنول A (2'-2, bis (4-hydroxyphenyl) propane, A Bisphenol A (BPA)) یک ماده سمی زیست محیطی با فعالیت استروژنیک است (۱) که به طور گسترده در تولید پلاستیک‌های پلی‌کربنات (برای مثال بطری‌های آب) و رزین‌های اپوکسی (پوشش داخلی قوطی کنسروهای مواد غذایی) استفاده می‌شود (۲). مولکول‌های بیسفنول A با کمک پیوندهای استری به یکدیگر متصل و در ساختمان ظروف پلاستیکی به کار می‌روند. این پیوندهای استری تحت درجه حرارت بالا و تغییرات PH دچار هیدرولیز می‌شوند و سبب نفوذ بیسفنول A به داخل غذاها و نوشیدنی‌ها می‌گردند (۳).

منبع اصلی قرارگیری اکثر افراد در معرض بیسفنول A، رژیم غذایی است در حالی که هوا، گرد و غبار و آب دیگر منابع مواجهه با بیسفنول A محسوب می‌شوند (۴).

تحقیقات نشان می‌دهد که بیسفنول A می‌تواند ناهنجاری‌هایی را در سیستم تولیدمثل نر به وجود آورد از جمله موجب ایجاد استرس اکسیداتیو به وسیله تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species (ROS)) (۳). کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی مثل گلوکوتاتیون ردوکتاز (Glutathione reductase, GR) و گلوکوتاتیون پراکسیداز (Glutathione peroxidase, GSH-Px) سوپراکسید دیسموتاز (SOD, dismutase) و کاتالاز (Catalase, CAT) در بیضه رت‌های بالغ (۵)، کاهش وزن بیضه و اپیدیدیم، کاهش تعداد و تحرک اسپرم‌ها (۱)، تخریب اتصالات بین سلول‌های سرتولی و بی‌ثبات سازی سد خونی-بیضه‌ای (۶)، آتروفی و واکوئل‌زایی در اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز (۷)، تغییر غلظت هورمون‌هایی از جمله تستوسترون (۸)، هورمون لوتئینی (LH: Luteinizing Hormone) و محرک فولیکولی (FSH: Follicle Stimulating Hormone) می‌گردند (۹).

هورمون برای حفظ فرآیند اسپرماتوژنز در سطوح متعدد ضروری است (۱۰)، به طوری که در غیاب آن، تشکیل سد خونی-بیضه‌ای به خطر می‌افتد و سلول‌های جنسی نابالغ به صورت زود هنگام از سلول‌های سرتولی جدا می‌شوند. اختلال در هر یک از

مراحل وابسته به هورمون تستوسترون می‌تواند منجر به اختلال در اسپرماتوژنز و ناباروری گردد (۱۱)، هم‌چنین بیسفنول A به دلیل شباهت ساختاری با ۱۷-بتا استرادیول می‌تواند با اتصال به هر دو نوع گیرنده استروژن ( $ER_{\alpha}$  و  $ER_{\beta}$ )، گیرنده‌هایی را که قبلاً در دسترس ۱۷-بتا استرادیول بوده‌اند را اشغال کند و از این رو هم به عنوان آگونیست اندوکراین و هم آنتاگونیست آندروژن‌ها عمل می‌کند (۳).

ویتامین E موثرترین آنتی‌اکسیدانت زنجیرشکن و محلول در چربی است (۱۲). آلفا-توکوفرول فعال‌ترین و رایج‌ترین شکل ویتامین E است که در روغن‌های گیاهی، جوانه گندم و سبزیجات برگ‌دار سبز یافت می‌شود (۱۳).

عملکرد اصلی ویتامین E، جلوگیری از گسترش واکنش‌های رادیکال‌های آزاد و محافظت از چربی‌های غیر اشباع غشا است (۱۴). این ویتامین با مهار پراکسیداسیون لیپیدی به بهبود روند اسپرماتوژنز کمک می‌کند (۱۰) و سبب کاهش بیان پروتئین BAX (Bcl-2-associated X protein) و در نهایت کاهش آپوپتوز در سلول‌های بیضه موش‌ها می‌شود (۱۵). کمبود این ویتامین می‌تواند سبب دژنراسیون سلول‌های اسپرماتوگونی، دژنراسیون لوله‌های منی‌ساز و آسیب به بافت بیضه شود (۱۶). نقش حفاظتی ویتامین E بر بافت بیضه در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از آلاینده‌های زیست محیطی از قبیل سرب و کروم گزارش شده است (۱۰، ۱۷).

با توجه به کاربرد گسترده بیسفنول A در ساختمان بسیاری از وسایل مورد استفاده در زندگی روزمره انسان و خصوصیات استروژنی و استرس اکسیداتیوی این ماده که اثرات مضر بر عملکرد هورمون‌های آندروژن و بافت‌های مختلف از جمله بیضه در پی دارد، این پژوهش با هدف بررسی اثر حفاظتی ویتامین E بر روی بافت بیضه موش‌های بالغ نژاد ویستار به دنبال تیمار با بیسفنول A صورت گرفت.

## روش بررسی

انتخاب گروه‌ها، تیمار گروه‌ها و نمونه‌گیری: برای انجام این پژوهش، از ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزنی  $220 \pm 15$  گرم خریداری شده از انیستیتو پاستور ایران استفاده شد.

برای تهیه برش‌های IUR (Isotropic uniform random sampling) از بافت بیضه، از روش Orientator استفاده شد. روش کار به این صورت بود که ابتدا بیضه با موقعیت تصادفی یکنواخت و با چرخش دلخواه روی ساعت فی ( $\Phi$ ) (که به طور یکنواخت تقسیم شده) قرار داده شد. سپس یک عدد تصادفی بین ۰ و ۹ انتخاب و بیضه در راستای آن عدد برش زده شد. نتیجه این برش، ایجاد دو قطعه از بیضه بود. یکی از دو قطعه بیضه بر روی ساعت تا ( $\theta$ ) طوری قرار داده شد که سطح برش خورده در طول محور ۰-۰ ساعت تا قرار گیرد. آنگاه یک عدد تصادفی انتخاب و قطعه در امتداد آن عدد برش داده شد. ادامه برش‌ها به صورت 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 تا ( $\theta$ ) قرار گیرد. سپس مجدداً یک عدد تصادفی انتخاب و بیضه در امتداد آن برش زده شد (۲۶) اسلایدهای تهیه شده از هر بیضه با حفظ جهت در داخل بسکت‌های مخصوصی قرار داده شد و فرآیند پاساژ بافتی به وسیله دستگاه پاساژ بافتی مدل Leica انجام گرفت. بعد از قالب‌گیری بافت‌ها در درون بلوک‌های پارافینی و تهیه برش‌های ۵ و ۲۰ میکرونی از آن‌ها توسط دستگاه میکروتوم، رنگ‌آمیزی مقاطع با روش هایدن هاین آزان صورت گرفت (۲۷).

#### بررسی‌های تغییرات استریولوژی

برای محاسبه میزان چروکیدگی بافتی، با ابزاری به نام تروکار، سه قطعه گرد از برش‌های IUR بیضه هر موش قبل از فرآیند پاساژ بافتی تهیه شد. دو قطر عمود بر هم هر کدام از قطعات گرد به وسیله کولیس ورنیه اندازه‌گیری و میانگین شعاع آن‌ها (شعاع قبل از چروکیدگی: r-before) محاسبه گردید. بعد از مراحل پاساژ بافتی، برش‌گیری و رنگ‌آمیزی، مجدداً دو قطر عمود بر هم هر کدام از برش‌های رنگ‌آمیزی شده، اندازه‌گیری و میانگین شعاع آن‌ها (شعاع بعد از چروکیدگی: r-after) محاسبه شد سپس با استفاده از فرمول زیر میزان چروکیدگی مربوط به بیضه هر موش به دست آمد (۲۷).

$$\text{Shrinkage} = 1 - \left( \frac{r_{\text{after}}}{r_{\text{before}}} \right)^2$$

موش‌ها در خانه حیوانات دانشگاه اراک و در شرایط استاندارد شامل دمای  $21 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، نور محیطی با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند، سپس به طور تصادفی در ۴ گروه ۶ تایی شامل کنترل (تیمار با روغن ذرت)، بیسفنول A ( $250 \text{ mg/kg}$ )، ویتامین E ( $150 \text{ mg/kg}$ ) و بیسفنول A ( $250 \text{ mg/kg}$ ) + ویتامین E ( $150 \text{ mg/kg}$ ) گروه‌بندی شدند.

دوزهای مورد استفاده برای تیمار با بیسفنول A (Sigma-Aldrich) (Sigma-Aldrich, Steinheim, و ویتامین E (Chemie GmbH, USA) بر اساس پژوهش‌های گذشته انتخاب شد (۱۸،۱۹).

تیمار به صورت گاواژ دهانی و به مدت ۵۶ روز (۳ بار در هفته) برای تمامی گروه‌ها انجام گرفت. تیمار ۳ بار در هفته گروه‌ها بر اساس نتایج مطالعه Morgan و همکاران در سال ۲۰۱۴ انتخاب شده است. ایشان گزارش کردند که تیمار دهانی رت‌های نر بالغ نژاد آلبینو با دوز  $25 \text{ mg/kg/day}$  از بیسفنول A به مدت ۵۰ روز (۳ بار در هفته) موجب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در بافت بیضه از طریق افزایش در سطح MDA، کاهش غلظت GSH (Glutathione) و کاهش فعالیت CAT و SOD گردید (۲۰).

هم چنین انتخاب طول مدت تیمار در این پژوهش به دلیل طی شدن یک دوره کامل اسپرماتوژنز در موش صحرایی بود (۲۱). به علت روش تیمار دهانی و با توجه به جامد بودن بیسفنول A و سمیت آن، این ماده توسط روغن ذرت رقیق شد (۲۲). ویتامین E هم به دلیل غلیظ بودن، ابتدا توسط یک ماده حلال (روغن ذرت) رقیق گردید (۲۳). انتخاب روغن ذرت بر اساس مطالعات انجام شده صورت گرفت.

#### آماده‌سازی بافت و تهیه اسلایدها

۵۶ روز بعد از تیمار، موش‌ها وزن و سپس توسط دی‌اتیل‌اتر بیهوش شدند. پس از تشریح، بیضه راست جهت انجام بررسی‌های بافت‌شناسی خارج و وزن آن اندازه‌گیری شد. برای تخمین حجم بیضه نیز از روش غوطه‌ورسازی (Immersion) استفاده گردید (۲۴). سپس بیضه‌ها جهت ثبات بافتی به درون فیکساتیو MDF (Modified Davidson's fluid) (۲۵) به مدت یک هفته (با دو بار تعویض فیکساتیو) منتقل شدند.

منظور، به طور میانگین ۵ میدان دید از هر برش ۵ میکرونی بافت بیضه با  $ob=10$  انتخاب شد و با قرار دادن پروب مخصوص سطح بر روی میدان‌های دید انتخابی، کل نقاط برخورد کرده از پروب با تصویر بیضه و کل نقاط برخورد کرده با اپی‌تلیوم زایشی شمارش شد و دانسیته حجمی اپی‌تلیوم زایشی محاسبه گردید. سپس برای محاسبه دانسیته سطحی اپی‌تلیوم زایشی، تعداد برخوردهای پروب مخصوص سطح با سطح لومنی اپی‌تلیوم زایشی و مجموع نقاط برخورد کرده با اپی‌تلیوم زایشی شمارش شد با گذاشتن این اعداد در فرمول مربوطه، دانسیته سطحی اپی‌تلیوم زایشی به دست آمد (۲۷).

$$Sv=2 \times \frac{\sum_{i=1}^n I_i}{L/P \cdot \sum_{i=1}^n P_i}$$

به منظور تخمین میانگین ضخامت غشای پایه لوله‌های منی‌ساز، از تمام برش‌های ۵ میکرونی توسط عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ به طور میانگین ۲۴-۲۶ میدان دید انتخاب و پروب دارای خطوط ایزوتروپیک بدون سوگیری بر روی میدان‌های دید انتخابی انداخته شد. از محل برخورد خطوط پروب با سطح داخلی غشای پایه، خطی عمود بر مماس سطح خارجی غشا کشیده و سپس طول این خط توسط نرم‌افزار موتیک اندازه‌گیری شد. سرانجام با روش اندازه‌گیری هارمونیک، میانگین ضخامت غشای پایه لوله‌های منی‌ساز محاسبه گردید (۳۰).

#### بررسی و شمارش سلولهای بافت بیضه (جنسی و سوماتیک)

برای محاسبه تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید (گرد و دراز) و سلول‌های سرتولی از روش Optical dissector، فریم مخصوص شمارش و دستگاه میکروکیتور مدل ND 221 B, Heidenhain, Germany استفاده شد. به این ترتیب که از همه برش‌های ۲۰ میکرونی مربوط به بیضه هر موش توسط میکروسکوپ (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر) به طور تصادفی تعدادی میدان دید انتخاب شد. در هر میدان دید ابتدا از دو ناحیه به نام ناحیه حفاظت شده به ضخامت ۵ میکرون از بالا و پایین (به دلیل آرتیفکت احتمالی در سطح بافت) صرف نظر شد. سپس به‌میزان ۱۰ میکرون در جهت محور Z در عمق بافت پایین آمده و در حین

برای به‌دست آوردن حجم واقعی بیضه، مقدار عدم چروکیدگی در حجم حاصل از روش غوطه‌ورسازی ضرب شد (۲۷).

به‌منظور محاسبه حجم لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی، با استفاده از روش نمونه‌گیری تصادفی منظم، از هر برش ۵ میکرونی به طور میانگین ۵ میدان دید انتخاب شد. با قرار دادن تصادفی پروب نقطه بر روی هر میدان دید، نقاط برخورد کرده به کل بافت ( $\sum P_{total}$ ) و نقاط برخورد کرده به لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی ( $\sum Pi$ ) به طور مجزا شمارش گردید و دانسیته حجمی هر یک از آن‌ها محاسبه شد. سپس با ضرب دانسیته حجمی در حجم کل بیضه، حجم مربوط به هر جز به دست آمد (۲۷).

$$V_{Density} = \frac{\sum_{i=1}^n P_i}{\sum_{i=1}^n P_t}$$

$$V_{interstitial} = V_{testis} \times V_{Density}$$

برای تخمین طول لوله‌های منی‌ساز ابتدا توسط میکروسکوپ و با عدسی ۱۰، از هر برش ۵ میکرونی به طور کاملا تصادفی ۵ میدان دید انتخاب و سپس فریم شمارش بر روی هر یک از میدان‌های دید انداخته شد. آن‌گاه تعداد مقطع‌های لوله‌های منی‌ساز که با فریم انتخاب شدند (به طور میانگین در هر بافت بیضه ۱۳۰-۱۵۰ لوله منی‌ساز)، شمارش گردیدند. دانسیته طولی لوله‌های منی‌ساز طبق فرمول زیر محاسبه شد و با ضرب آن در حجم نهایی بیضه، طول مطلق لوله‌های منی‌ساز به دست آمد (۲۸).

$$Lv = 2 \times \frac{\sum_{i=1}^n Q_i}{a/f \cdot \sum_{i=1}^n P_i}$$

$$L_{vt} = L_v \times V_{te}$$

به‌منظور تخمین میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز، فریم مخصوص شمارش به طور تصادفی بر روی میدان‌های دید انتخابی (بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر) انداخته شد و قطر کوچک حدود ۱۵۰-۱۳۰ لوله منی‌ساز انتخاب شده توسط پروب با کمک نرم‌افزار موتیک (Motic image 2000) اندازه‌گیری شد (۲۹). ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی با تقسیم دانسیته حجمی (Vv) بر دانسیته سطحی (Sv) اپی‌تلیوم زایشی به دست آمد که برای این

غلظت MDA بر حسب نانومول بر میلی لیتر (nmol/ml) و بر اساس منحنی استاندارد محاسبه شد (۳۱).

$$\text{غلظت MDA} = \frac{\text{جذب نمونه}}{1/56 \times 10^5} = Y \rightarrow Y \times 10^6 \text{ (nmol/ml)}$$

#### بررسی و سنجش میزان تستوسترون سرم

برای اندازه گیری تستوسترون سرم از کیت DRG Testosterone (EIA-1559) استفاده شد که بر اساس سنجش ایمونولوژیکی آنزیمی رقابتی تهیه شده است (۳۲). روش اندازه گیری نیز مطابق دستورالعمل ارائه شده در کیت مذکور صورت گرفت.

#### تجزیه و تحلیل آماری

داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS (version 16) و روش آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی تجزیه و تحلیل و تفاوت میانگین ها در سطح (p < 0/05) معنی دار در نظر گرفته شد.

#### ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه اراک تایید شده است. لازم به ذکر است که در این تحقیق، کلیه ضوابط اخلاقی رعایت گردیده است

### نتایج

#### حجم کل بیضه، لوله های منی ساز و بافت بینابینی

میانگین حجم کل بیضه (P < 0/03) و لوله های منی ساز (P < 0/04) در گروه بیسفنول A نسبت به سایر گروه ها کاهش معنی داری را نشان داد، افزایش پارامترهای فوق در گروه تیمار همزمان ویتامین E با بیسفنول A نسبت به گروه بیسفنول A معنی دار بود (P < 0/04). از مقایسه میانگین حجم بافت بینابینی در بین چهار گروه، اختلاف معنی داری مشاهده نشد (P > 0/05) (جدول ۱)

جدول ۱: مقایسه میانگین حجم کل بیضه، حجم لوله های منی ساز و بافت بینابینی در گروه های مختلف موش صحرایی بعد از ۸ هفته (۳ بار در هفته) تیمار با بیسفنول A (۲۵۰ mg/kg) و ویتامین E (۱۵۰ mg/kg).

| گروه ها             | حجم کل بیضه (mm <sup>3</sup> ) | حجم لوله های منی ساز (mm <sup>3</sup> ) | حجم بافت بینابینی (mm <sup>3</sup> ) |
|---------------------|--------------------------------|---|--------------------------------------|
| کنترل               | ۱۰۷۰/۲±۶۸/۲۱ <sup>a</sup>      | ۷۹۸/۶۵±۶۸/۲۱ <sup>a</sup>               | ۲۶۶/۲۲±۲۹/۹۱ <sup>a</sup>            |
| بیسفنول A           | ۹۱۴/۳۷±۵۴/۱۸ <sup>b</sup>      | ۶۵۸/۵۷±۴۴/۶ <sup>b</sup>                | ۲۵۵/۵±۱۶/۹۶ <sup>a</sup>             |
| بیسفنول A+ویتامین E | ۱۰۲۷/۷±۶۱/۴۴ <sup>a</sup>      | ۷۴۶/۰۷±۳۶/۹۴ <sup>a</sup>               | ۲۸۱/۶۱±۳۸/۲۱ <sup>a</sup>            |
| ویتامین E           | ۱۰۴۶/۱±۵۸/۵۹ <sup>a</sup>      | ۷۹۸/۹۱±۶۰/۴۹ <sup>a</sup>               | ۲۴۶/۸۴±۲۳/۰۹ <sup>a</sup>            |

مقادیر به صورت Means±SD می باشد. میانگین ها با کد حرف های مختلف، دارای تفاوت معنی داری نسبت به یکدیگر می باشند. (One way ANOVA, Tukey's test, P < 0.05)

حرکت تمام انواع سلول های ذکر شده که با فریم مورد نظر انتخاب شدند، شمارش گردید (میانگین ۱۳۰-۱۵۰ عدد از هر سلول). بعد از محاسبه دانسیته عددی سلول ها، عدد حاصل در حجم نهایی بیضه مربوطه ضرب شد تا تعداد کل انواع سلول های مورد نظر به دست آید (۲۷).

#### بررسی و سنجش میزان مالون دی آلدئید سرم

بعد از عمل خون گیری از قلب موش ها و سانتریفوژ نمونه های خون به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۶۰۰۰g، با استفاده از سمپلر، سرم هر نمونه جدا و مجدداً به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ شد. در پایان، نمونه های سرم در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد تا زمان مورد نیاز نگهداری شدند. برای اندازه گیری غلظت مالون دی آلدئید سرم (MDA: Malondialdehyde) از محلول TCA-TBA-HCL شامل تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱۵٪ گرم بر میلی لیتر، ۳۷۵٪ گرم بر میلی لیتر و اسید کلریدریک (HCL) ۲۵٪/۲۵۰ گرم بر میلی لیتر و اسید کلریدریک (HCL) ۲۵٪/۲۵۰ گرم بر میلی لیتر استفاده شد. روش کار به این صورت بود که ۰/۵ میلی لیتر از نمونه با ۱ میلی لیتر از محلول TCA-TBA-HCL مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری جوش (۹۵ درجه سانتی گراد) قرار داده شد. سپس نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع روایی به دقت جدا و جذب آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در برابر بلانک خوانده شد. در این روش MDA با TBA واکنش داده و ترکیبی با رنگ صورتی تولید می کند که پرتوهای با طول موج ۵۳۲ نانومتر را جذب می کند. غلظت MDA با استفاده از ضریب خاموشی (Extinction coefficient) آن که عبارت است از  $1/56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$  محاسبه گردید و بر حسب نانومول بر میلی لیتر (nmol/ml) بیان شد.

معنی‌داری را نشان داد. در گروه بیسفنول A + ویتامین E، ویتامین E توانست پارامترهای ذکر شده را نسبت به گروه بیسفنول A به طور معنی‌داری افزایش داده و به حد گروه کنترل نزدیک کند. در گروه ویتامین E، افزایش معنی‌داری در میانگین ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز در مقایسه با گروه بیسفنول A و گروه بیسفنول A + ویتامین E مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۲: مقایسه میانگین طول، قطر، ضخامت غشا پایه و ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز در گروه‌های مختلف موش صحرایی بعد از ۸ هفته (۳ بار در هفته) تیمار با بیسفنول A (۲۵۰ mg/kg) و ویتامین E (۱۵۰ mg/kg).

| گروه‌ها             | طول لوله‌های منی‌ساز (m) | قطر لوله‌های منی‌ساز (μm) | ضخامت غشا پایه لوله‌های منی‌ساز (μm) | میانگین ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز (μm) |
|---------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------------------|--|
| کنترل               | ۱۶/۹۴±۳/۲۷ <sup>a</sup>  | ۲۵۰/۴۴±۲/۵۰ <sup>a</sup>  | ۸/۴۰±۰/۲ <sup>a</sup>                | ۷۷/۰۳±۶/۹۹ <sup>ab</sup>                             |
| بیسفنول A           | ۱۵/۶۹±۳/۲۵ <sup>a</sup>  | ۲۳۶/۶۳±۶/۲۱ <sup>b</sup>  | ۷/۸۷±۰/۱۶ <sup>b</sup>               | ۶۲/۴۲±۷/۳۳ <sup>c</sup>                              |
| بیسفنول A+ویتامین E | ۱۵/۳۰±۰/۵۶ <sup>a</sup>  | ۲۴۵/۹±۳/۹۷ <sup>a</sup>   | ۸/۲۱±۰/۲۶ <sup>a</sup>               | ۷۲/۰۵±۲/۶ <sup>a</sup>                               |
| ویتامین E           | ۱۶/۳۵±۱/۹۱ <sup>a</sup>  | ۲۵۱/۵۵±۶/۱۹ <sup>a</sup>  | ۸/۳۶±۰/۱۴ <sup>a</sup>               | ۸۲/۹۱±۴/۹۲ <sup>b</sup>                              |

مقادیر به صورت Means±SD می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌داری نسبت به یکدیگر می‌باشند. (One way ANOVA, Tukey's test, P< 0.05)

(P<۰/۰۰۱)، اسپرماتید دراز (P<۰/۰۰۱) و سلول‌های سرتولی (P<۰/۰۱) در گروه بیسفنول A نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. در گروهی که هم‌زمان با بیسفنول A، ویتامین E هم دریافت می‌کرد، کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت، اسپرماتید گرد، اسپرماتید دراز و سرتولی به طور معنی‌دار (P<۰/۰۰۹) و در حد گروه کنترل جبران شد (جدول ۳).

طول لوله‌های منی‌ساز، قطر، ضخامت غشا پایه و ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز در بین چهار گروه تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵)، در صورتی که میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز (P<۰/۰۰۱)، ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز (P<۰/۰۰۲) و ضخامت غشای پایه لوله‌های منی‌ساز (P<۰/۰۰۱) در گروه بیسفنول A نسبت به گروه کنترل کاهش

تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید (گرد و دراز) و سرتولی میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه بیسفنول A، فقط نسبت به گروه ویتامین E کاهش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۰۷) ولی نسبت به گروه کنترل این کاهش معنی‌دار نبود. هم‌چنین کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت (P<۰/۰۰۲)، اسپرماتید گرد

جدول ۳: مقایسه میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید گرد و دراز و سرتولی در گروه‌های مختلف موش صحرایی بعد از ۸ هفته (۳ بار در هفته) تیمار با بیسفنول A (۲۵۰ mg/kg) و ویتامین E (۱۵۰ mg/kg).

| گروه‌ها             | تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی ×۱۰ <sup>۶</sup> | تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت ×۱۰ <sup>۶</sup> | تعداد سلول‌های اسپرماتید گرد ×۱۰ <sup>۶</sup> | تعداد سلول‌های اسپرماتید دراز ×۱۰ <sup>۶</sup> | تعداد سلول‌های سرتولی ×۱۰ <sup>۶</sup> |
|---------------------|--|---|---|--|--|
| کنترل               | ۹/۶۸±۱/۰۷ <sup>ab</sup>                      | ۱۴۵±۱۰/۹۹ <sup>a</sup>                      | ۲۲۲/۹۶±۱۸/۲ <sup>ab</sup>                     | ۲۱۱/۸۲±۲۱/۹۰ <sup>a</sup>                      | ۳۲/۹۳±۳/۶ <sup>ab</sup>                |
| بیسفنول A           | ۷/۷۶±۱/۰۵ <sup>a</sup>                       | ۱۲۱/۴۸±۸/۰۲ <sup>b</sup>                    | ۱۶۷/۶۵±۱۱/۳۳ <sup>c</sup>                     | ۱۵۸/۳۱±۱۱/۵۲ <sup>b</sup>                      | ۲۵/۸۶±۳/۲۸ <sup>c</sup>                |
| بیسفنول A+ویتامین E | ۸/۵۳±۰/۷۷ <sup>ab</sup>                      | ۱۴۱/۹۳±۸/۷۳ <sup>a</sup>                    | ۲۰۳/۶۶±۱۱/۶۲ <sup>a</sup>                     | ۱۹۷/۰۸±۱۶/۱۳ <sup>a</sup>                      | ۳۱/۸۶±۳/۲۵ <sup>a</sup>                |
| ویتامین E           | ۱۰/۶±۱/۹۳ <sup>b</sup>                       | ۱۵۵/۹۱±۱۰/۰۳ <sup>a</sup>                   | ۲۳۲/۳۱±۱۸/۲۷ <sup>b</sup>                     | ۲۲۲/۴۹±۲۲/۹۷ <sup>a</sup>                      | ۳۷/۴۱±۵/۰۷ <sup>b</sup>                |

مقادیر به صورت Means±SD می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌داری نسبت به یکدیگر می‌باشند. (One way ANOVA, Tukey's test, P< 0.05)

## وزن رت و وزن بیضه

کنترل کاهش معنی داری داشت ( $P < 0.01$ ) در حالی که وزن بیضه در گروه تیمار همزمان بیسفنول A + ویتامین E نسبت به گروه بیسفنول A افزایش معنی داری را نشان داد ( $P < 0.04$ ) (جدول ۴).

میانگین وزن موش ها بعد از اتمام دوره تیمار در بین گروه های مختلف تفاوت معنی داری را نشان نداد ( $P > 0.05$ )، اما میانگین وزن بیضه موش های تحت تیمار با بیسفنول A نسبت به گروه

جدول ۴: مقایسه میانگین وزن بدن و وزن بیضه در گروه های مختلف موش صحرایی بعد از ۸ هفته (۳ بار در هفته) تیمار با بیسفنول A ( $250 \text{ mg/kg}$ ) و ویتامین E ( $150 \text{ mg/kg}$ ). مقادیر به صورت  $\text{means} \pm \text{sd}$  می باشد.

| گروه ها               | وزن بدن قبل از تیمار (gr) | وزن بدن در پایان دوره تیمار (gr) | وزن بیضه (gr)     | نسبت به وزن بدن (gr) |
|-----------------------|---------------------------|----------------------------------|-------------------|----------------------|
| کنترل                 | $231/16 \pm 10/57^a$      | $292/93 \pm 27/11^a$             | $1/52 \pm 0/07^a$ | $0/0051$             |
| بیسفنول A             | $232 \pm 11/31^a$         | $280 \pm 14/28^a$                | $1/36 \pm 0/09^b$ | $0/0048$             |
| بیسفنول A + ویتامین E | $229/66 \pm 13/69^a$      | $283/38 \pm 13/42^a$             | $1/49 \pm 0/07^a$ | $0/0052$             |
| ویتامین E             | $231/33 \pm 8/91^a$       | $301/63 \pm 15/35^a$             | $1/51 \pm 0/06^a$ | $0/0050$             |

میانگین ها با کد حرف های مختلف، دارای تفاوت معنی داری نسبت به یکدیگر می باشند ( $P < 0.05$ , One way ANOVA, Tukey's test).

## غلظت هورمون تستوسترون و مالون دی آلدیید سرم

افزایش معنی داری در سطح MDA سرم رت های تحت تیمار با بیسفنول A در مقایسه با گروه کنترل دیده شد ( $P < 0.03$ ) در حالی که ویتامین E منجر به کاهش معنی دار ( $P < 0.04$ ) سطح MDA سرم در گروه بیسفنول A + ویتامین E نسبت به گروه بیسفنول A گردید (جدول ۵).

در گروه تیمار شده با بیسفنول A، میانگین غلظت تستوسترون سرم کاهش معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد ( $P < 0.02$ ). میانگین غلظت تستوسترون سرم در گروه بیسفنول A + ویتامین E نسبت به هر دو گروه کنترل و بیسفنول A تغییر معنی داری نداشت ( $P > 0.05$ ). هم چنین

جدول ۵: مقایسه میانگین غلظت هورمون تستوسترون و مالون دی آلدیید سرم خون در گروه های مختلف موش صحرایی بعد از ۸ هفته (۳ بار در هفته) تیمار با بیسفنول A ( $250 \text{ mg/kg}$ ) و ویتامین E ( $150 \text{ mg/kg}$ ). مقادیر به صورت  $\text{Means} \pm \text{SD}$  می باشد.

| گروه ها               | غلظت تستوسترون سرم (ng/ml) | غلظت مالون دی آلدیید سرم (nmol/ml) |
|-----------------------|----------------------------|------------------------------------|
| کنترل                 | $1/72 \pm 0/25^a$          | $2/84 \pm 0/62^a$                  |
| بیسفنول A             | $1/18 \pm 0/39^b$          | $3/67 \pm 0/33^b$                  |
| بیسفنول A + ویتامین E | $1/62 \pm 0/32^{ab}$       | $2/87 \pm 0/49^a$                  |
| ویتامین E             | $1/73 \pm 0/20^a$          | $2/51 \pm 0/42^a$                  |

میانگین ها با کد حرف های مختلف، دارای تفاوت معنی داری نسبت به یکدیگر می باشند ( $P < 0.05$ , One way ANOVA, Tukey's test).

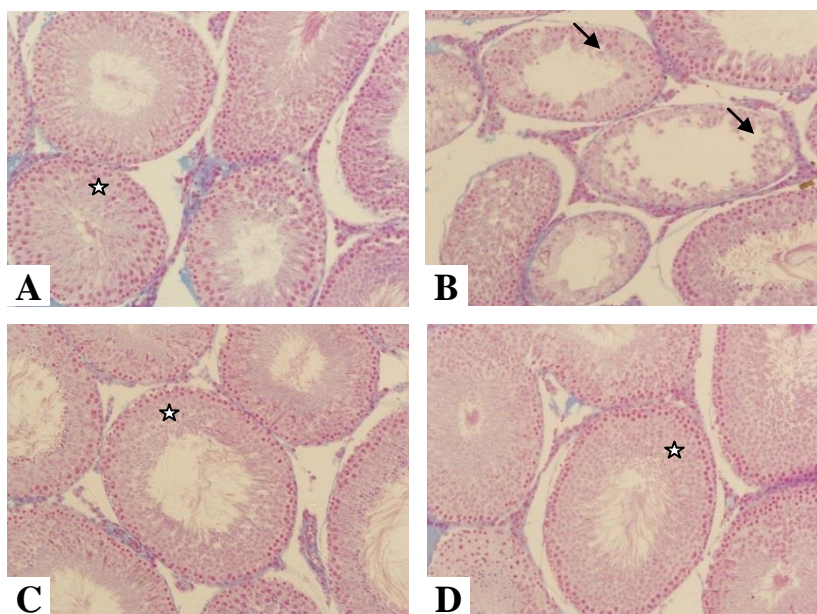
## تغییرات هیستوپاتولوژی بیضه

گروه ها کاهش یافت و در برخی از لوله های منی ساز، واکوئل زایی در اپی تلیوم زایشی مشاهده گردید (شکل ۱-B). بررسی بافت شناسی بیضه موش های گروه بیسفنول A + ویتامین E نشان داد که تجویز ویتامین E توانسته اکثر تخریب ها و بی نظمی های ایجاد شده توسط بیسفنول A را جبران کند به طوری که لوله های منی ساز دارای ساختار و

در بیضه موش های گروه کنترل، لوله های منی ساز و اپی تلیوم زایشی حالت طبیعی خود را حفظ کرده و سلول ها دارای نظم و به هم پیوستگی طبیعی بودند (شکل ۱-A). در بیضه موش های گروه بیسفنول A، آتروفی لوله های منی ساز مشاهده شد. در این گروه ارتفاع اپی تلیوم زایشی نسبت به دیگر

و ارتفاع اپی تلیوم زایشی آن‌ها تا حدودی نسبت به گروه‌های دیگر افزایش نشان داد (شکل ۱-D).

اسپرماتوژنز طبیعی بودند (شکل ۱-C). در گروه ویتامین E، لوله‌های منی‌ساز ساختار طبیعی همانند گروه کنترل داشته



شکل ۱: تصاویر میکروسکوپی از بافت بیضه موش‌های صحرایی بالغ در گروه‌های مختلف (برش‌های ۵ میکرونی، رنگ‌آمیزی هایدن آزان، بزرگنمایی  $\times 200$ ): (A) آرایش طبیعی اپی تلیوم زایشی (ستاره) در گروه کنترل. (B) کاهش ارتفاع اپی تلیوم زایشی (پیکان)، بی‌نظمی و واکنش شدن اپی تلیوم زایشی (نوک پیکان) و تخریب اسپرماتوژنز در گروه تیمار شده با بیسفنول A. (C) آرایش تقریباً طبیعی اپی تلیوم زایشی و اسپرماتوژنز نرمال (ستاره) در گروه تیمار شده با بیسفنول A + ویتامین E. (D) آرایش طبیعی اپی تلیوم زایشی (ستاره) در گروه تیمار شده با ویتامین E.

ارتفاع اپی تلیوم زایشی و ضخامت غشا پایه لوله‌های منی‌ساز، کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت، اسپرماتید (گرد و دراز) و سرتولی گردید (۷، ۸). در این راستا در مطالعه‌ای که بر روی موش‌های صحرایی نژاد SD در طی ۶ هفته تیمار دهانی با دوز  $100 \text{ mg/kg/day}$  از بیسفنول A انجام گرفت، قطر لوله‌های منی‌ساز کاهش معنی‌داری را نشان داد و علت آن، نازک شدن اپی تلیوم زایشی گزارش شد (۸). هم‌چنین کاهش قطر و ارتفاع اپی تلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز در بیضه موش‌های صحرایی تحت تیمار با دوز  $50 \text{ mg/kg/day}$  از بیسفنول A به مدت ۸ هفته (۶ روز در هفته) گزارش شده است (۷). دلیل این کاهش قطر لوله‌های منی‌ساز، کاهش تعداد سلول‌های سرتولی و جنسی در اثر آپوپتوز و یا اختلال در فرآیند اسپرماتوژنز بیان شده است (۳۵). آزادسازی ناهنگام سلول‌های جنسی نابالغ و کاهش ضخامت اپی تلیوم زایشی می‌تواند به دلیل کاهش بیان برخی از پروتئین‌های موجود در اتصالات بین سلولی در اپی

## بحث

در این مطالعه بیسفنول A موجب کاهش معنی‌دار میانگین حجم کل بیضه و حجم لوله‌های منی‌ساز در مقایسه با گروه کنترل گردید. با توجه به این‌که بیش‌تر حجم بیضه از لوله‌های منی‌ساز تشکیل شده است (۳۳)، بنابراین، کاهش حجم بیضه ممکن است ناشی از کاهش حجم لوله‌های منی‌ساز باشد.

کاهش حجم لوله‌های منی‌ساز نیز می‌تواند به دلیل آتروفی و کاهش قطر لوله‌های منی‌ساز در اثر تیمار با بیسفنول A باشد که در پژوهش دیگران نیز گزارش شده است (۷، ۳۴). از طرفی آتروفی لوله‌های منی‌ساز در گروه بیسفنول A احتمالاً از طریق کاهش فعالیت آنزیم‌های استروئیدوژنیک بیضه (۳۴)، آپوپتوز در سلول‌های جنسی و کاهش تعداد آن‌ها (۱۸، ۳۵) ایجاد شده است. از طرفی، هم‌سو با نتایج مطالعات قبلی در این پژوهش تیمار موش‌های بالغ با بیسفنول A باعث کاهش معنی‌دار قطر،

بیان برخی ژن‌های موثر در فرآیند اسپرماتوژنز از قبیل (Outer dense fiber protein 1 *ODFI* و Transition protein-1) *TNPI* (۴۱)، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در بیضه از جمله گلوکوتائون‌ردوکتاز، گلوکوتائون‌پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز (۵) سلول‌های جنسی را در برابر اسپرماتوژنز تحت تاثیر اثر نامطلوب خود قرار دهد.

هم‌چنین با در نظر گرفتن ارتباطات گسترده‌ای که در سطح بیوشیمیایی و مولکولی بین سلول‌های جنسی و سرتولی در سراسر روند اسپرماتوژنز وجود دارد بنابراین هر عاملی که باعث اختلال در عملکرد و زنده ماندن سلول‌های سرتولی شود نیز اثرات عمیقی بر اسپرماتوژنز دارد (۴۲). از اینرو می‌توان گفت که در مطالعه حاضر کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت و اسپرماتید می‌تواند به علت اختلال در عملکرد و کاهش تعداد سلول‌های سرتولی در اثر بیسفنول A می‌باشد.

چنان‌که می‌دانیم، رادیکال‌های آزاد باعث راه‌اندازی فرآیند پراکسیداسیون لیپیدی در موجودات زنده می‌شوند و مالون دی‌آلدهید یکی از محصولات نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع در سلول‌ها می‌باشد. سنجش میزان مالون دی‌آلدهید معمولاً به عنوان شاخصی برای اثبات دخالت رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو شناخته می‌شود (۴۳).

به همین جهت در راستای نتایج تحقیقات صورت گرفته در پژوهش حاضر نیز افزایش غلظت مالون دی‌آلدهید می‌تواند ناشی از افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در اثر تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و کاهش سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی (۵) در اثر تیمار با بیسفنول A در نظر گرفته شود.

چنان‌که نتایج این مطالعه نشان داد، میانگین وزن بدن در پایان دوره تیمار در بین گروه‌های مختلف، تغییر معنی‌داری را نشان نداد. این یافته با نتایج برخی از مطالعات صورت گرفته در این زمینه مطابقت دارد (۸،۲۲). علت کاهش وزن بدن در اثر برخی آلاینده‌های زیست‌محیطی و سموم، کم شدن مصرف غذا در نتیجه بی‌اشتهایی می‌باشد (۴۴). بنابراین این احتمال وجود دارد که این مقدار دوز بیسفنول A در این دوره زمانی در حدی نبوده است که اثری بر وزن رت‌ها داشته باشد. همان‌طور

تلیوم زایشی بر اثر بیسفنول A باشد که منجر به تخریب این اتصالات و نیز سد خونی-بیضه‌ای می‌گردد (۶،۳۶). علاوه بر این کاهش سطح تستوسترون و نیز اختلال در سد خونی-بیضه‌ای باعث جلوگیری از پیشروی تقسیمات سلولی در سلول‌های جنسی شده و در نتیجه موجب جدا شدن این سلول‌ها به صورت نابالغ و زود هنگام از سلول‌های سرتولی می‌گردد (۱۱). کاهش غلظت هورمون تستوسترون ممکن است دلیل دیگری برای اختلال در روند اسپرماتوژنز، آتروفی لوله‌های منی‌ساز و دژنره شدن سلول‌های جنسی در اثر بیسفنول A باشد (۷،۳۷). چنان‌که مشاهده شد، در این مطالعه غلظت تستوسترون در رت‌های تیمار شده با بیسفنول A نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد. در این زمینه باید گفت که بیسفنول A می‌تواند از طریق کاهش بیان پروتئین حامل کلاسترول که StAR نام دارد (تستوسترون در سلول‌های لیدیک از کلاسترول ساخته می‌شود) و کاهش بیان برخی از آنزیم‌های استروئیدوژنیک موثر در فرآیند تولید تستوسترون از قبیل  $P450_{17\alpha}$ ،  $P450_{scc}$  و  $17\beta\text{-HSD}$  mRNA و کاهش تعداد سلول‌های لیدیک، سبب کاهش غلظت تستوسترون سرم گردد (۳۸). کاهش ترشح LH هیپوفیزی (هورمون محرک ترشح تستوسترون از سلول‌های لیدیک)، اختلال در اتصال هورمون LH به گیرنده‌های خود (۹) نیز می‌تواند یک دلیل دیگر برای کاهش غلظت تستوسترون در اثر تیمار با بیسفنول A باشد.

این آلاینده زیست‌محیطی می‌تواند از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو، افزایش آسیب به DNA سلول‌های اسپرماتوسیت و تغییر نسبت بین سلول‌های جنسی در مراحل مختلف رشد و نمو (۲۲) و القای آپوپتوز از طریق فعال‌سازی مسیر سیگنالدهی Fas/FasL در سلول‌های جنسی (۳۹)، اختلال در اتصال بین سلول‌های سرتولی از طریق کاهش بیان پروتئین‌های N-کاده‌رین، اوکلودین، زونولا اوکلودنس-۱ و کانکسین-۴۳ و یا تغییر جایگاه آن‌ها بر روی غشا (۴۰)، تغییر غلظت هورمون‌های FSH و LH و تستوسترون (۹)، کاهش

اپی تلیوم زایشی (۴۵) می تواند در پایدارسازی غشاهای سلولی و حفظ روند اسپرماتوژنز نقش داشته باشد. بنابراین اثر ویتامین E در پیشگیری موثر از آسیب به اپی تلیوم زایشی لوله های منی ساز در گروه تیمار هم زمان بیسفنول A + ویتامین E ممکن است به نقش این ویتامین بر پایدارسازی غشاهای سلولی و حفظ اتصال بین سلول های سرتولی و جنسی مرتبط باشد.

### نتیجه گیری

نتایج ما نشان داد که بیسفنول A به عنوان یک مخرب اندوکرینی موجب آسیب های بافتی و سلولی در بافت بیضه موش صحرایی بالغ شد و ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدانت توانست اثرات نامطلوب بیسفنول A بر تغییرات بافت شناسی ذکر شده و تعداد سلول های جنسی و سرتولی در گروه تیمار هم زمان بیسفنول A + ویتامین E، تعدیل و جبران کند. بنابراین می توان گفت که ویتامین E از طریق مهار رادیکال های آزاد و حفظ فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی و تنظیم سطح تستوسترون موجب بهبود روند اسپرماتوژنز و جبران تغییرات نامطلوب بافتی ناشی از سمیت بیسفنول A شده است و پیشنهاد می شود از آن به عنوان یک مکمل بالقوه در موارد مسمومیت با بیسفنول A استفاده شود.

### سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه خانم مرضیه امجدی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی 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 کمک های ارزشمند مسئولین آزمایشگاه سلولی-تکوینی دانشگاه اراک به خصوص خانم نادری در این مطالعه صمیمانه سپاسگزاری می شود.

**تعارض در منافع:** وجود ندارد

که نتایج این مطالعه نشان داد ویتامین E توانست اثرات مخرب بیسفنول A را در خصوص کاهش وزن و حجم بیضه و حجم لوله های منی ساز را در حد گروه کنترل جبران نماید. هم چنین افزایش معنی داری در میانگین قطر، ارتفاع اپی تلیوم زایشی و ضخامت غشا پایه لوله های منی ساز، تعداد سلول های اسپرماتید، اسپرماتوسیت و سرتولی در گروه تیمار هم زمان بیسفنول A + ویتامین E نسبت به گروه بیسفنول A مشاهده شد. سطح مالون دی آلدئید در رت هایی که به طور هم زمان بیسفنول A ویتامین E را دریافت کرده بودند نیز کاهش نشان داد. ویتامین E احتمالاً با تقویت سیستم آنتی اکسیدانتی و مهار رادیکال های آزاد (۱۷)، اثرات اکسیداتیو بیسفنول A بر بافت بیضه را خنثی و از این طریق سبب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و MDA سرم در گروه تیمار هم زمان بیسفنول A + ویتامین E شده است.

علاوه بر این، در این مطالعه ویتامین E اثر حفاظتی بر سطح هورمون تستوسترون در رت های تیمار شده با بیسفنول A و ویتامین E داشت و میزان آن را در حد گروه کنترل حفظ کرد. مکانیسم ویتامین E در حفظ سطح هورمون تستوسترون ممکن است ناشی از تاثیر آن بر فعالیت آنزیم های  $17\beta$ -HSD و هیدروکسی استروئید دهیدروژناز (آنزیم های موثر در سنتز تستوسترون) باشد (۱۰). نقش ویتامین E در جلوگیری از کاهش تعداد سلول های اپی تلیوم زایشی و بهبود روند اسپرماتوژنز در برابر آلاینده های زیست محیطی در نتایج محققان دیگر نیز مشاهده شده است (۴۴، ۱۰).

این ویتامین نقش مهمی در حفظ و بقای اسپرماتیدها داشته (۱۰) و باعث کاهش بیان پروتئین Bax و کاهش آپوپتوز در سلول های جنسی شده (۱۵) و از این طریق می تواند از کاهش سلول های اپی تلیوم زایشی نیز جلوگیری کند. ویتامین E هم چنین با افزایش سطح هورمون تستوسترون (۱۶، ۱۰)، افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی در بیضه (۱۰)، مهار آسیب اکسیداتیو به اسیدهای چرب غیر اشباع در غشاهای سلولی و اندامک ها (۲۳) و حفظ اتصال بین سلول های سرتولی و جنسی در

## References:

- 1- Tamilselvan P, Bharathiraja K, Vijayaprakash S, Balasubramanian MP. *Protective role of lycopene on bisphenol A induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats*. Int J Pharm Bio Sci 2013; 4(4): 131-43.
- 2- Mourad IM, Khadrawy YA. *The sensitivity of liver, kidney and testis of rats to oxidative stress induced by different doses of bisphenol A*. Int J life sci pharma res 2012; 2 (2): 19-28.
- 3- Chouhan S, Yadav SK, Prakash J, Singh SP. *Effect of Bisphenol A on human health and its degradation by microorganisms: a review*. Ann Microbiol 2014; 64(1): 13-21.
- 4- Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. *Human exposure to bisphenol A (Bisphenol A)*. Reprod Toxicol 2007; 24(2): 139-77.
- 5- El-Beshbishy HA, Aly H, El-Shafey M. *Lipoic acid mitigates bisphenol A-induced testicular mitochondrial toxicity in rats*. Toxicol Ind Health 2012; 29(10): 875-87.
- 6- 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; 19(2): 181-88.
- 7- Mohamed DA, Arafa MH. *Testicular toxic changes induced by bisphenol A in adult albino rats: a histological, biochemical, and immunohistochemical study*. Egypt J Histol 2013; 36(1): 233-45.
- 8- Gurmeet KSS, Rosnah I, Normadiah MK, Das S, Mustafa AM. *Detrimental effects of bisphenol A on development and functions of the male reproductive system in experimental*. EXCLI Journal 2014; 13: 151-60.
- 9- Helal E, Badawi M, Soliman M, Abdel-Kawi N, Fadel H, Abozaid N. *Physiological and histopathological studies on bisphenol-A compound as xenoestrogen in male albino rats*. EJHM 2013; 50: 127-36.
- 10- Chandra AK, Chatterjee A, Ghosh R, Sarkar M. *Vitamin E-supplementation protect chromium (VI)-induced spermatogenic and steroidogenic disorders in testicular tissues of rats*. Food Chem Toxicol 2010; 48(3): 972-79.
- 11- El-Shenawy NS, AL-Harbi MS, Hamza RZ. *Effect of vitamin E and selenium separately and in combination on biochemical, immunological and histological changes induced by sodium azide in male mice*. Exp Toxicol Pathol 2014; 67(1): 65-76.
- 12- Walker WH. *Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis*. J Spermatogenesis 2011; 1(2): 116-20.
- 13- Birangane RS, Chole DG, Prakash Reddy K. *A review of antioxidants*. JIAOMR 2011; 23(5): 351-53.
- 14- Wang X, Quinn PJ. *The location and function of vitamin E in membranes (Review)*. Mol Membr Biol 2000; 17(3): 143-56.
- 15- Kukner A, Oner J, Oner H, Ozan E. *Effect of the Vitamin E on Expression of Apoptosis-Related Proteins in Immobilized Rat Testes*. J Anim Vet Adv 2010; 9(1): 180-85.

- 16- Hamadouche NA, Sadi N, Kharoubi O, Slimani M, Aoues A. *The protective effect of vitamin E against genotoxicity of lead acetate intraperitoneal administration in male rat*. Arch Biol Sci 2013; 65(4): 1435-45.
- 17- Ayinde OC, Ogunnowo S, Ogedegbe RA. *Influence of Vitamin C and Vitamin E on testicular zinc content and testicular toxicity in lead exposed albino rats*. BMC Pharmacol Toxicol 2012; 13(1): 1-8.
- 18- Deng MX, Wu DS, Chen XG, Zhang LS, Xu PY. *[Experimental studies on male reproductive toxicity of bisphenol A in vitro and vivo.]* Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi 2004; 38(6): 383-87.
- 19- Adaikpoh MA, Obi FO. *Prevention of cadmium-induced alteration in rat testes and prostate lipid patterns by  $\alpha$ -tocopherol*. Afr J Biochem Res 2009; 3(10): 321-25.
- 20- Morgan AM, El-Ballal SS, El-Bialy BE, EL-Borai NB. *Studies on the potential protective effect of cinnamon against bisphenol A- and octylphenol-induced oxidative stress in male albino rats*. Toxicology Reports 2014; 1(2014): 92-101.
- 21- Creasy DM. *Evaluation of Testicular Toxicity in Safety Evaluation Studies: The Appropriate Use of Spermatogenic Staging*. Toxicol Pathol 1997; 25(2): 119-31.
- 22- Wu HJ, Liu C, Duan WX, 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.
- 23- Hamza RZ, AL-Harbi MS. *Monosodium glutamate induced testicular toxicity and the possible ameliorative role of vitamin E or selenium in male rats*. Toxicol Rep 2014; 1: 1037-45.
- 24- Mandarim-de-Lacerda CA. *Stereological tools in biomedical research*. An Acad Bras Cienc 2003; 75(4): 469-86.
- 25- 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): 524-33.
- 26- Howard C, Reed M. *Unbiased Stereology: Three Dimensional Measurement in Microscopy*. J Anat 1999; 194(1): 153-57.
- 27- Soleimani Mehranjani M, Noorafshan A, Momeni HR, Abnosi MH, Mahmoodi M. *Stereological study of the effects of vitamin E on testis structure in rats treated with paranonylphenol*. Asian J Androl 2009; 11(4): 508-16.
- 28- Hoseini L, Roozbeh J, Sagheb M, Doust SK, Noorafshan A. *Nandrolonedecanoate increases the volume but not the length of the proximal and distal convoluted tubules of the mouse kidney*. Micron 2009; 40(2): 226-30.
- 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- Nyengaard JR, Ferrando RE, Hays SR, Fahy JV, Woodruff PG. *Applying stereology to measure thickness of the basement membrane zone in bronchial biopsy specimens*. Allergy clin Immunol 2003; 112(6): 1243-45.
- 31- Esterbauer H, Cheeseman KH. *Determination of aldehydic lipid peroxidation products:*

- malondialdehyde and 4-hydroxynonenal*. *Methods Enzymol* 1990; 186: 407-21.
- 32- Afify M, Abd Elmaksoud M, Mosa T, Elshaer M, Kotb N. *Differential effects of amitriptyline treatment on testicular and liver functions in adult male rats*. *New York Sci* 2010; 3(3): 10-18.
- 33- Sharma Rk. *Physiology of male gametogenesis*. In: Falcone T, Hurd W (editors). *Clinical Reproductive Medicine and Surgery*. 3rd ed. New York: Springer; 2013: 73-83.
- 34- Takahashi O, Oishi S. *Testicular toxicity of dietary 2, 2-bis (4-hydroxyphenyl) propane (bisphenol A) in F344 rats*. *Arch Toxicol* 2001; 75(1): 42-51.
- 35- Kovačević K, Budefeld T, Majdič G. *Reduced seminiferous tubule diameter in Mice neonatally exposed to perfume*. *Slov Vet Res* 2006; 43: 177-183.
- 36- Anahara R, Yoshida M, Toyama Y, et al. *Estrogen agonists, 17 beta-estradiol, Bisphenol A, and diethylstilbestrol decrease cortactin expression in the mouse testis*. *Arch Histol Cytol* 2006; 69(2): 101-7.
- 37- Singh J, Handelsman DJ. *The Effects of Recombinant FSH on Testosterone-Induced Spermatogenesis in Gonadotrophin-Deficient (hpg) Mice*. *J Androl* 1996; 17(4): 382-93.
- 38- Nakamura D, Yanagiba Y, Duan Z, et al. *Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol*. *Toxicol Lett* 2010; 194(1-2): 16-25.
- 39- Li YJ, Song TB, Cai YY, et al. *Bisphenol A Exposure Induces Apoptosis and Upregulation of Fas/FasL and Caspase-3 Expression in the Testes of Mice*. *Toxicol Sci* 2009; 108(2): 427-36.
- 40- Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, et al. *In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action*. *Reprod Toxicol* 2007; 24(2): 178-98.
- 41- Qiu LL, Wang X, Zhang XH, et al. *Decreased androgen receptor expression may contribute to spermatogenesis failure in rats exposed to low concentration of bisphenol A*. *Toxicol Lett* 2013; 219(2): 116-24.
- 42- Cheng CY, Mruk DD. *Cell Junction Dynamics in the Testis: Sertoli-Germ Cell Interactions and Male Contraceptive Development*. *Physiol Rev* 2002; 82(4): 825-74.
- 43- Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. *Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker*. *Wiad Lek* 2004; 57(9-10): 453-55.
- 44- Hanadi BA, Kelany AHM, Elqudsi FM, Ameen HA, El Karium SA. *The possible protective role of antioxidant (Selenium, Vitamin E) in reducing smoking effects on testes of Albino Rats*. *Mol Cell Biochem* 2009; 321: 37-43.
- 45- Kontush A, Finckh B, Karten B, Kohlschütter A, Beisiegel U. *Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein*. *J Lipid Res* 1996; 37(7): 1436-48.

## Protective role of vitamin E in preventing the adverse effects of bisphenol A on rat testis tissue: A stereological evaluation

Malek Soleimani Mehranjani<sup>1†</sup>, Monireh Mahmoodi<sup>2</sup>, Marziye Amjadi<sup>3</sup>

### Original Article

**Introduction:** Bisphenol A (BPA) as an environmental pollutant has estrogenic effects and can induce oxidative stress in the testis tissue. The aim of the present study was to investigate the role of vitamin E (Vit E), as a strong antioxidant, on the adverse effect of BPA on adult rat testis tissue.

**Methods:** Male rats (220±15g) were divided into 4 groups (n=6/each): control, Bisphenol A (250 mg/kg/day), Bisphenol A+ Vit E (150 mg/kg/day) and Vit E and orally treated for 56 days. At the end of the treatment, the right testis was removed and after fixation, sectioning, tissue processing and staining with Heidenhain's Azan method was evaluated stereologically. The serum testosterone and malondialdehyde (MDA) levels were also measured. Data were analyzed using one way ANOVA and Tukey's test and the means were considered significantly different (P<0.05).

**Results:** A significant decrease in the total volume of testis, volume and diameter of seminiferous tubule and its height of the germinal epithelium and thickness of the basement membrane, number of spermatids, spermatocyte and sertoli cells, Serum testosterone levels and a significant increase in the serum MDA level were found in the Bisphenol A group compared to the control group. The above parameters were compensated to the control level in the Bisphenol A + Vit E group.

**Conclusion:** Vitamin E, as a strange antioxidant, could compensate many adverse the effects of Bisphenol A on the testis tissue, so it is suggested that it can be used as a potential supplement in case of BPA intoxication.

**Keywords:** Bisphenol A, Vitamin E, Stereology, Testis, Rat.

**Citation:** Soleimani Mehranjani M, Mahmoodi M, Amjadi M. *Protective role of vitamin E in preventing the adverse effects of bisphenol A on rat testis tissue: A stereological evaluation.* J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2018; 26(2): 97-110.

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

<sup>3</sup>Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

\*Corresponding author: Tel: 09181617098, email: m-soleimani@araku.ac.ir