اثر حفاظتی عصاره‌ی زنجبیل (*Zingiber officinalis*) در برابر سمیت ناشی از بیس‌فنل‌آ بر بافت بیضه موش‌های نژاد NMRI

سیدمحمدعلی شریعت‌زاده[1]*، عاطفه حسنوند[2]، حسن فلاح‌حسینی[3]

۱- استاد، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، اراک، ایران

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، اراک، ایران

۳- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج، ایران

* آدرس مکاتبه: اراک، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، کدپستی: ۸۳۴۹-۸-۳۸۱۵۶

تلفن: ۴۱۷۳۴۰۱ (۰۸۶۳)، نمابر: ۴۱۷۳۴۰۹ (۰۸۶۳)

پست الکترونیک: s-shariatzadeh@araku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۲۴ **تاریخ تصویب:** ۹۴/۱۲/۱۷

چکیده

مقدمه: بیس‌فنل‌آ یک ترکیب استروژنی گزنوبیوتیک است و می‌تواند موجب استرس اکسیداتیو در بافت بیضه شود. زنجبیل دارای خواصی از جمله ضد تهوع، ضد لخته شدن خون، ضد باکتری، آنتی‌اکسیدان و محرک هضم غذا می‌باشد.

هدف: این مطالعه با هدف تعیین تأثیر عصاره زنجبیل بر سمیت ناشی از بیس‌فنل‌آ بر بافت بیضه موش انجام شد.

روش بررسی: تعداد ۲۴ سر موش نر بالغ نژاد NMRI به ۴ گروه مساوی کنترل، بیس‌فنل‌آ (۲۴۰ mg/kg/day)، عصاره‌ی زنجبیل (۵۰۰ mg/kg/day) و بیس‌فنل‌آ+ عصاره زنجبیل تقسیم شدند. پس از ۳۴ روز تیمار دهانی با تعیین وزن موش‌ها، بیضه راست خارج و فیکس شد. پس از انجام برش‌گیری، پاساژ بافتی و رنگ‌آمیزی هایدن هان آزان توسط تکنیک استریولوژی پارامترهای مختلف بیضه مورد ارزیابی قرار گرفت. سطح مالوندی‌آلدئید (MDA) و تستوسترون سرم اندازه‌گیری شد. داده‌ها با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه آنالیز و تفاوت میانگین‌ها در حد (P<۰/۰۵) معنی‌دار در نظرگرفته شد.

نتایج: وزن بیضه، حجم کل بیضه، حجم لوله‌های منی‌ساز، قطر و ارتفاع اپیتلیوم زایشی، تعداد کل اسپرماتیدها، اسپرماتوسیت‌ها، سلول‌های سرتولی و شاخص‌های اسپرماتوژنز در گروه بیس‌فنل‌آ در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۴). افزایش معنی‌داری در سطوح MDA و کاهش معنی‌داری در تستوسترون سرم درگروه بیس‌فنل‌آ در مقایسه با گروه کنترل یافت شد (P<۰/۰۰۱). پارامترهای فوق درگروه بیس‌فنل‌آ + عصاره‌ی زنجبیل تا حدی نسبت به گروه بیس‌فنل‌آ جبران شد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد عصاره زنجبیل بر سمیت ناشی از بیس‌فنل‌آ بر بافت بیضه نقش محافظتی دارد، بنابراین زنجبیل احتمالا" بتواند در بهبود اثرات نامطلوب بیس‌فنل‌آ بر سیستم تولیدمثلی نر مفید باشد.

گل‌واژگان: استریولوژی، بیس‌فنل‌آ، بیضه، عصاره‌ی زنجبیل، موش

مقدمه

بیس‌فنل‌آ نوعی ترکیب آلی با فرمول شیمیایی $C_{15}h_{16}o_2$، یک ترکیب مقاوم و هیدروفوبیک است [۱] و یک زنواستروژن محیطی است که به عنوان مونومر پلاستیک‌های پلی‌کربناتی و یک جزء از رزین‌های اپوکسی و پلی‌استایرن است که در تولید انواع وسایل و مواد از جمله پرکننده دندان، ظروف یکبار مصرف و پوشش‌های داخلی قوطی‌های کنسرو، بطری‌های نگهداری آب معدنی، شیشه‌های تغذیه اطفال استفاده می‌شود [۲].

بیس‌فنل‌آ یک شبه استروژن ضعیف می‌باشد که به دلیل داشتن اثرات استروژنی جزء مختل‌کننده‌های سیستم اندوکرینی طبقه‌بندی می‌شود. در واقع بیس فنل‌آ به عنوان یک تراتوژن (عامل ناهنجاری) عمل می‌کند و ممکن است منجر به تغییر در تمایز جنسی و عملکرد غدد جنسی شود. تحقیقات نشان می‌دهد که قرار گرفتن جوندگان در معرض بیس‌فنل‌آ در دوران بارداری باعث اختلال در عملکرد غدد درون‌ریز و سیستم تولیدمثلی نوزادان نر و ماده می‌شود [۴، ۳] که با افزایش سطح رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپید و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون موجب آسیب در بافت بیضه می‌شود [۵].

زنجبیل از ریزوم گیاهی با نام علمی *Zingiber oficinalis* به دست می‌آید و تاریخچه مصرفی طولانی دارد. این گیاه از ایران به سوی غرب رواج یافت و هم اکنون در طب سنتی چین نیز نقش مهمی ایفا می‌کند. در طب قدیم ایران به عنوان گیاه ضد آماس معرفی شده است. این گیاه به عنوان یکی از پرسابقه‌ترین گیاه دارویی در علم پزشکی بخصوص در درمان التهاب در آرتریت می‌باشد [۶].

در راستای اثرات ضدالتهابی این گیاه، گزارش‌های متعدد نشان داده‌اند ترکیبات فعال این گیاه مثل جینجرول، شوگول و کورکومین به خوبی توانایی مهار تولید پروستاگلاندین‌ها، نیتریت اکسید و حتی اینترلوکین‌های درگیر در التهاب را دارند علاوه بر اینها و به طوراختصاصی‌تر آنزیم‌های تولیدکننده این مواد واسطه‌گر التهابی توسط مواد مؤثره گیاه زنجبیل مهار می‌شوند که از میان این ترکیبات زینجبرون ترکیب اصلی آن است و خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی دارد. مشخص شده ترکیبات جینجرول، شوگول و زینجبرون موجود در زنجبیل خاصیت آنتی اکسیدانی دارند [۷].

در طی تحقیقاتی مشاهده شد که زنجبیل باعث افزایش سوپراکسیددسموتاز، کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش ظرفیت ضداکسایشی در موش‌ها می‌شود [۸].

این پژوهش به منظور بررسی اثر عصاره زنجبیل به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی بر اثرات سمی بیس‌فنل‌آ روی بافت بیضه موش‌های بالغ نژاد NMRI با روش‌های استریولوژیکی انجام شد.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام این تحقیق ۲۴ سر موش نر بالغ از نژاد ویستار از انیستیتوپاستور ایران خریداری و در خانه حیوانات دانشگاه اراک در شرایط استاندارد (دمای ۲ ± ۲۱ درجه سانتی‌گراد و نور محیطی با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) و دسترسی آزاد به آب و غذا جهت سازگاری با محیط به مدت ۲ هفته نگهداری شد. موش‌های نر به ۴ گروه (N=۶) به ترتیب زیر تقسیم شدند: کنترل، بیس‌فنل‌آ (۲۴۰ mg/kg/day)، عصاره زنجبیل (۵۰۰ mg/kg/day)، بیس‌فنل‌آ+ عصاره‌ی زنجبیل.

تیمار موش‌ها با فاصله زمانی ۲۴ ساعت به مدت ۳۴ روز انجام گرفت. بیس‌فنل‌آ، از شرکت (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) و عصاره زنجبیل از مرکز گیاهان دارویی اراک خریداری، همراه آب مقطر به موش‌ها خورانده شد و مورد استفاده قرار گرفت که دوز مورد استفاده برای تیمار با بیس‌فنل‌آ ۲۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در هر روز [۹] و برای عصاره‌ی زنجبیل دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم [۱۰] انتخاب شد. پس از پایان دوره تیمار ابتدا موش‌ها وزن شدند سپس با دی اتیل اتر بیهوش شدند و پس از تشریح، بیضه راست برداشته و وزن شد و سپس حجم بیضه با روش شناورسازی (Immersion) اندازه‌گیری شد [۱۱]. بعد از شستشو در نرمال سالین به منظور ثبوت بافت بیضه در فیکساتیو MDF به مدت ۷ روز قرار داده شد [۱۲]، سپس از روش orientator برای به دست آوردن

برش‌های IUR استفاده شد [۱۳] به این منظور بیضه‌ها بر روی ساعت فی (ϕ) و تتا (Θ) به صورت تصادفی قرار داده شد. سپس عدد تصادفی از جدول اعداد بین صفر تا ۹ انتخاب و سپس بیضه در امتداد عدد انتخاب شده برش زده شد. نتیجه این برش دو قطعه از بیضه بود. قطعه اول بر روی ساعت تتا (Θ) طوری قرارگرفت که سطح برش خورده در طول محور ۰-۰ ساعت تتا قرارگرفت. سپس یک عدد تصادفی انتخاب و این قطعه مجدداً 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 تتا (Θ) قرارگیرد. سپس یک عدد تصادفی انتخاب و برش‌ها به موازات عدد انتخاب شده تهیه شد [۱۴].

سپس برش‌ها آماده شده در دستگاه پاساژ قرارداده شد و فرآیند پاساژ بافتی صورت گرفت. بعد از پاساژ بافتی، قالب‌گیری و تهیه بلوک پارافینی که حاوی نمونه هستند توسط میکروتوم برش‌گیری صورت گرفت، از بلوک‌ها برش‌های ۵ و ۲۰ میکرونی با تنظیم میکروتوم گرفته شد و روی لام قرار می‌دهیم، سپس لام‌ها در سبدهای مخصوص رنگ‌آمیزی قرار داده شد و به روش هایدن هان آزان رنگ‌آمیزی شدند [۱۵].

محاسبه چروکیدگی

برای محاسبه میزان چروکیدگی با استفاده از تروکار به صورت تصادفی دو یا سه قطعه گرد از برش‌های IUR بیضه هر موش با استفاده از کولیس ورنیه دو قطر عمود بر هم اندازه‌گیری و میانگین شعاع آنها محاسبه شد.

پس از پاساژ بافتی و رنگ‌آمیزی مجدداً قطر عمود بر هم قطعات اندازه‌گیری و میانگین شعاع آنها به عنوان شعاع پس از تثبیت بافتی در نظر گرفته شد و طبق فرمول زیر میزان چروکیدگی مربوط به بیضه هر موش محاسبه شد [۱۶]:

$$\text{Shirinkage}=1-\left(\frac{r_{after}^{2}}{r_{befor}^{2}}\right)^{\frac{3}{2}}$$

با استفاده از فرمول Shirinkage-۱، حجم نهایی نسبت به حجم اولیه محاسبه شد و سپس با ضرب آن در حجمی که به روش Immersion به دست آمده بود، حجم واقعی بیضه به دست آمد.

محاسبه حجم لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی

به منظور محاسبه حجم لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی با استفاده از پروب نقطه به طور تصادفی و بدون هیچ سوگیری روی میدان‌های دید ۵ میکرونی انداخته شد و با شمارش نقاط دانسیته حجمی اجزای نامبره محاسبه شد و سپس با ضرب دانسیته حجمی، حجم هر یک در حجم نهایی بیضه حجم لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی محاسبه شد [۱۳].

$$V_{V_{interstitial}}=\frac{\sum_{i=1}^{n} pi}{\sum_{i=1}^{n} P_t}$$

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

محاسبه طول لوله‌های منی‌ساز

برای محاسبه طول لوله‌های منی‌ساز با استفاده از فریم شمارش که دارای دو خط ممنوعه در طرف چپ و پایین خود و دوخط مجاز در بالا و سمت راست و یک به علاوه در مرکز داشت به طور کاملاً تصادفی بر روی هر کدام از میدان‌های دید انداخته شد. دانسیته طولی لوله‌های منی‌ساز محاسبه شد [۱۷]. برای به دست آوردن طول کل لوله‌های منی‌ساز طبق فرمول زیر دانسیته طولی در حجم نهایی بیضه ضرب شد:

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

$$L_{Vt} = L_V \times Vtestis$$

اندازه‌گیری قطر لوله‌های منی‌ساز

برای محاسبه قطر لوله‌های منی‌ساز از فریم مخصوص شمارش که یک فریم صلیب مانند به طور تصادفی انداخته شد سپس قطر کوچک لوله‌های منی‌ساز در امتداد قطر کوچک لوله‌های فریم صلیبی شکل با کمک نرم‌افزار موتیک اندازه‌گیری شد، میانگین قطر ۱۵۰ – ۱۳۰ لوله منی‌ساز مربوط به بیضه هر موش محاسبه شد [۱۸].

محاسبه ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز

برای محاسبه ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی به طور میانگین ۵ میدان دید از هر اسلاید ۵ میکرونی بافت بیضه‌ی مربوط به هر موش با ob=۱۰ به طور تصادفی انتخاب شد، برای به دست آوردن دانسیته حجمی اپی‌تلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز از پروب نقطه مخصوص سطح استفاده شد. سپس کل نقاط برخورد کرده از پروب با تصویر بیضه مربوط به هرمیدان دید شمارش، سپس از بین نقاط برخورد کرده با بافت بیضه نقاطی را که با اپیتلیوم‌زایشی لوله‌های منی‌ساز برخورد کرده بود، شمارش شد. بدین‌ترتیب دانسیته حجمی اپیتلیوم زایشی به دست آمد، آنگاه تعداد برخوردهایی که پروب مخصوص سطح با سطح داخلی اپیتلیوم زایشی داشت، شمارش شد. سپس از فرمول زیر برای به دست آوردن دانسیته سطحی از اپیتلیوم زایشی استفاده شد [۱۸]:

$$H = \frac{Pv}{Sv}$$

محاسبه ضخامت غشاء پایه لوله‌های منی‌ساز

به منظور محاسبه میانگین ضخامت غشاء پایه لوله‌های منی‌ساز از روش اندازه‌گیری هارمونیک استفاده شد. با استفاده از پروب مخصوص را که دارای سه خط موازی و مساوی بود بدون سوگیری بر روی عکس‌ها گرفته شد. از محل برخورد خطوط پروب با غشاء داخلی غشاء پایه یک خط عمود بر خط مماس غشاء خارجی کشیده و توسط نرم‌افزار موتیک اندازه‌گیری شد. با استفاده از فرمول زیر میانگین برخورد اندازه‌گیری شده برای هر موش محاسبه شد [۱۹]:

Harmonic mean Thickness layer= 8/3π (number of meants)/(sum of the reciprocal of orthogonal intercept length)

محاسبه‌ی تعداد سلول‌های اپیتلیوم در بافت بیضه

برای محاسبه تعداد انواع سلول‌های جنسی (اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سلول‌های سرتولی) از روش optical dissector و از فریم مخصوص شمارش استفاده شد به این صورت که از تمامی اسلایدهای ۲۰ میکرونی به طور میانگین تعدادی میدان دید با میکروسکوپ و بزرگنمایی ۱۰۰ (unbiased counting frame) انتخاب و از دستگاه میکروکتیور مدل HEIDEN HAN (ND221B) ساخت آلمان برای شمارش استفاده شد. ابتدا از دو ناحیه به نام Guard zoon به ضخامت ۵ میکرون از بالا و پایین برش‌های ۲۰ میکرونی برای شمارش صرف نظر شد، سلول ذکرشده را که با فریم موردنظر انتخاب شده‌اند و با خط ممنوعه برخورد نکرده بود را شمارش کردیم برای فیلدهای بعدی نیز این مراحل تکرار شد. به طور میانگین ۱۵۰ – ۱۳۰سلول در هر موش شمرده شد، سپس دانسیته عددی سلول‌ها به دست آمد عدد حاصل در حجم کل بیضه مربوطه ضرب شد و تعداد کل انواع سلول‌های مورد نظر محاسبه شد [۲۰].

از فرمول زیر برای محاسبه انواع سلول‌ها استفاده شد:

$$Nv = \frac{\sum_{i=1}^{n} Q_i}{h \cdot \sum_{i=1}^{n} p_i \cdot a/f}$$

N(total)=Nv×V(totaltestis)

ارزیابی اسپرماتوژنز در بافت بیضه

به منظور ارزیابی اسپرماتوژنز تعداد ۱۰۰ لوله منی‌ساز در هر بیضه جهت ارزیابی شاخص‌های زیر مورد بررسی قرار گرفتند. جهت مشخص نمودن شاخص ضریب تمایز لوله‌ای (TDI) [۲۱]. درصد لوله‌های منی‌سازی که دارای سه و یا بیشتر از سه رده سلول‌های اسپرماتوژنز تمایز یافته از سلول اسپرماتوگونی A بودند، محاسبه شد، شاخص بعدی ضریب اسپرماتوژنز (SPI) [۲۲] می‌باشد که بیانگر درصد لوله‌های منی‌ساز دارای اسپرمیوژنز طبیعی (حاوی اسپرم) می‌باشد، به منظور محاسبه ضریب سلول سرتولی (SCI) و ضریب میوزی (MI) به ترتیب نسبت تعداد سلول‌های زایا به تعداد سلول‌های سرتولی [۲۳] و نسبت تعداد اسپرماتیدهای گرد به اسپرماتوسیت‌های اولیه مشخص شد [۲۴].

محاسبه سنجش مالون‌دی‌آلدئید سرم (MDA)

ابتدا محلول TBA (تیوباربیوتیک اسید) ۳۷۵ درصد (وزن/حجم)، TCA (تری‌کلرواستیک اسید) ۱۵ درصد (وزن/حجم) HCL (اسیدکلریدریک) ۲۵ درصد نرمال تهیه شد. سپس به نسبت ۲ به ۱ (۲ میلی‌لیتر از محلول TBA-TCA-HCL و یک میلی‌لیتر از نمونه) در یک اپندرف مخلوط شد و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری قرار داده شد. بعد از خارج کردن نمونه‌ها از بن‌ماری به سرعت در زیر آب سرد خنک شده و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریوفوژ (1g یا 100rpm) شدند. بعد مایع رویی جدا شد و جذب آن در ۵۳۲ نانومتر در برابر بلانک که حاوی تمام ترکیبات به جزء نمونه بود، خوانده شد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از ضریب خاموشی (Cxtinction coefficient) آن که عبارت $1.56\times10^{5}M^{-1}CM^{-1}$ می‌باشد، محاسبه شد و بر حسب میکرومولار بیان شد [۲۵].

سنجش میزان غلظت تستوسترون سرم

برای اندازه‌گیری تستوسترون سرم از کیت Testosterone ELISA Kit,Cat No(ELA-1559) drg international,Inc). استفاده شد که بر اساس سنجش ایمنولوژیکی آنزیم رقابتی تهیه شده است [۲۶]. به طور خلاصه نمونه‌ها در چاهک ریخته شد و سپس محلول تستوسترون و محلول آنتی تستوسترون اضافه شد و به مدت ۹۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. چاهک‌ها سپس با آب دیونیزه شستشو شد و سوبسترا به هر چاهک افزوده شد و برای مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. سپس با افزودن محلول متوقف کننده واکنش پایان یافت و جذب آن در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری

در نهایت داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار spss مدل ۱۶ و روش آنالیز واریانس یک طرفه (Oneway ANOVA) و تست آماری Tukey مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظرگرفته شد.

نتایج

وزن موش و وزن بیضه (gr)

میانگین وزن موش پس از اتمام دوره تیمار در بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌دار نشان نداد (P> ۰/۰۵).

از مقایسه میانگین وزن بیضه کاهش معنی‌داری در گروه بیس‌فنل‌آ نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (P< ۰/۰۴). وزن بیضه در گروه تیماری همزمان با بیس‌فنل‌آ و عصاره زنجبیل نسبت به گروه بیس‌فنل‌آ تغییر معنی‌داری نداشت (P> ۰/۰۵) (جدول شماره ۱).

حجم کل بیضه، لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی

از مقایسه میانگین حجم کل بافت بیضه کاهش معنی‌داری در گروه بیس‌فنل‌آ نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (P< ۰/۰۳). میانگین حجم کل بافت بیضه در گروه بیس‌فنل‌آ+ زنجبیل نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵).

میانگین حجم لوله‌های منی‌ساز نیز در گروه بیس‌فنل‌آ نسبت به گروه کنترل (P<۰/۰۰۴) به طور معنی‌داری کاهش یافت. در حالی‌که میانگین حجم لوله‌های منی‌ساز در گروه

بیس‌فنل‌آ + زنجبیل در مقایسه با گروه بیس‌فنل‌آ و کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

از مقایسه میانگین حجم بافت بینابینی در تمام گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (جدول شماره ۲).

طول لوله‌های منی‌ساز (m)، قطر، ضخامت غشاء پایه و ارتفاع اپیتلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز (µm)

از مقایسه میانگین طول لوله‌های منی‌ساز و ضخامت غشاء پایه در بین چهار گروه مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

میانگین ارتفاع اپیتلیوم زایشی در گروه بیس‌فنل‌آ نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته بود (P<۰/۰۲). میانگین ارتفاع اپیتلیوم زایشی در گروه تیماری همزمان با بیس‌فنل‌آ و زنجبیل نسبت به گروه بیس‌فنل‌آ افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۱). ولی نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

جدول شماره ۱- مقایسه میانگین وزن بیضه (میلی‌گرم) و وزن موش (گرم) در گروه‌های مختلف موش ۳۴ روز پس از تیمار با بیس‌فنل‌آ (۲۴۰ mg/kg/day) و عصاره زنجبیل (۵۰۰ mg/kg/day)

گروه‌ها	میانگین وزن اولیه موش (گرم)	میانگین وزن موش در پایان تیمار(گرم)	میانگین وزن بیضه موش (گرم)
کنترل	۳۲/۰۱ ±۲/۲۴	۳۶/۳۱ ± ۳/۹۵	۰/۱۲۰ ± ۰/۰۰۸
بیس‌فنل‌آ	۳۳/۵۱ ± ۱/۷۶	۳۳/۷۰ ± ۳/۳۴	۰/۱۰۵ ± ۰/۰۱۰ a
بیس‌فنل‌آ + عصاره‌ی‌زنجبیل	۳۳/۲۰ ± ۱/۶۲	۳۴/۱۳ ± ۵/۰۱	۰/۱۱۶ ± ۰/۰۱۲
عصاره‌ی زنجبیل	۳۳/۳۶ ± ۱/۳۶	۳۴/۰۸ ± ۶/۱۹	۰/۱۲۱ ± ۰/۰۰۵

a مقایسه آماری بیس‌فنل‌آ نسبت به گروه کنترل (P< ۰/۰۴)

جدول شماره ۲- 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 بابیس‌فنل‌آ (۲۴۰ mg/kg/day) و عصاره زنجبیل (۵۰۰ mg/kg/day)

گروه‌ها	میانگین حجم کل بیضه (mm^3)	میانگین حجم لوله‌های منی‌ساز (mm^3)	میانگین حجم بافت‌بینابینی (mm^3)
کنترل	۸۳/۷۵ ± ۵/۹۹	۷۱/۷۸ ± ۵/۸۷	۱۱/۹۹ ± ۱/۶۲
بیس‌فنل‌آ	۶۶/۶۲ ± ۷/۱۵ a	۵۶/۵۸ ± ۶/۵۳ b	۱۰/۰۶ ± ۱/۶۸
بیس‌فنل‌آ + عصاره‌ی زنجبیل	۷۷/۰۴ ± ۹/۳۹	۶۴/۴۳ ± ۶/۷۷	۱۲/۶۲ ± ۳/۶۰
عصاره‌ی زنجبیل	۸۰/۷۳ ± ۷/۶۶	۶۹/۰۲ ± ۷/۲۱	۱۱/۷۳ ± ۲/۴۴

a و b مقایسه آماری بیس‌فنل‌آ نسبت به گروه کنترل که به ترتیب (P<۰/۰۳)، (P<۰/۰۴)

طول لوله‌های منی‌ساز (m)، قطر، ضخامت غشاء پایه و ارتفاع اپیتلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز (µm)

از مقایسه میانگین طول لوله‌های منی‌ساز و ضخامت غشاء پایه در بین چهار گروه مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

میانگین ارتفاع اپیتلیوم زایشی در گروه بیس‌فنل‌آ نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته بود (P<۰/۰۲). میانگین ارتفاع اپیتلیوم زایشی در گروه تیماری همزمان با بیس‌فنل‌آ و زنجبیل نسبت به گروه بیس‌فنل‌آ افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۱). ولی نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

کاهش معنی‌داری در میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز در گروه بیس‌فنل‌آ نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (P<۰/۰۰۴). میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز در گروه تیماری همزمان با بیس‌فنل‌آ و زنجبیل نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵) (جدول شماره ۳).

تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سرتولی

میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). در حالی‌که میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت گرد و دراز و سرتولی، در گروه بیس‌فنل‌آ نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت (P< ۰/۰۰۱).

در گروه تیماری همزمان بیس‌فنل‌آ و زنجبیل میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت، اسپرماتید گرد و دراز و سرتولی نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵) (جدول شماره ۴).

جدول شماره ۳- میانگین طول لوله‌های منی‌ساز (m)، قطر، ضخامت غشاء پایه و ارتفاع اپیتلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز (µm) در گروه‌های مختلف موش ۳۴ روز پس از تیمار با بیس‌فنل‌آ (۲۴۰ mg/kg/day) و عصاره زنجبیل (۵۰۰ mg/kg/day).

گروه‌ها	میانگین‌طول‌لوله‌های‌منی‌ساز (m)	قطر لوله‌های منی‌ساز (µm)	ضخامت غشاء پایه لوله‌های منی‌ساز (µm)	ارتفاع اپیتلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز (µm)
کنترل	۲/۰۴ ± ۰/۲۸	۱۶۲/۱۸ ± ۵/۷۰	۶/۱۸ ± ۰/۴۰	۵۳/۲۵ ± ۷/۵۰
بیس‌فنل آ	۱/۴۰ ± ۰/۲۸	۱۵۱/۳۴ ± ۶/۵۹ a	۵/۷۵ ± ۰/۲۵	۴۳/۳۰ ± ۲/۷۱b
بیس‌فنل‌آ + عصاره زنجبیل	۱/۶۵ ± ۰/۴۲	۱۶۰/۵۲ ± ۷/۱۷	۵/۸۹ ± ۰/۱۹	۵۷/۶۵ ± ۷/۴۳
عصاره‌ی زنجبیل	۲/۰۵ ± ۰/۵۷	۱۶۴/۵۲ ± ۶/۲۰	۵/۱۸ ± ۰/۵۸	۵۹/۲۴ ± ۲/۴۲

a و b مقایسه آماری بیس‌فنل‌آ نسبت به گروه کنترل که به ترتیب(p<۰,۰۲)، (p<۰,۰۰۴).

جدول شماره ۴- مقایسه میانگین تعداد انواع سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سرتولی ($\times 10^6$) در گروه‌های مختلف موش ۳۴ روز پس از تیمار با بیس‌فنل‌آ (۲۴۰ mg/kg/day) و عصاره زنجبیل (۵۰۰ mg/kg/day)

گروه‌ها	میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی $\times 10^6$	میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت $\times 10^6$	میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید گرد $\times 10^6$	میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید دراز $\times 10^6$	میانگین تعداد سلول‌های سرتولی $\times 10^6$
کنترل	۵/۳۸ ± ۰/۲۱	۲۱/۱۳ ± ۱/۸۰	۳۹/۰۱ ± ۴۱/۲۳	۴۰/۹۸ ± ۴/۶۱	۳/۱۰ ± ۰/۲۵
بیس‌فنل‌آ	۴/۷۷ ± ۰/۳۵a	۱۵/۸۶ ± ۱/۷۹a	۳۱/۷۱ ± ۳/۱۹a	۳۲/۰۹ ± ۱/۹۱ a	۲/۳۶ ± ۰/۲۸a
بیس‌فنل‌آ + عصاره‌ی زنجبیل	۴/۸۵ ± ۰/۶۱	۱۸/۶۸ ± ۱/۹۹	۳۵/۸۰ ± ۳/۵۸	۳۷/۷۳ ± ۶/۰۲	۲/۴۱ ± ۰/۲۵
عصاره‌ی زنجبیل	۴/۵۸ ± ۰/۱۵	۲۳/۴۱ ± ۲/۱۵	۳۸/۵۰ ± ۳/۴۵	۳۹/۱۴ ± ۱/۶۹	۲/۷۸ ± ۰/۲۰

a مقایسه آماری بیس‌فنل‌آ نسبت به گروه کنترل (P<۰/۰۰۱)

ارزیابی اسپرماتوژنز در بافت بیضه

میانگین ضریب سلول سرتولی و ضریب میوزی در بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). در حالی که کاهش معنی‌داری در میانگین ضریب اسپرمیوژنز (P<۰/۰۰۲) و ضریب تمایز لوله‌ای (P<۰/۰۰۱) در گروه بیس‌فنل‌آ نسبت به گروه کنترل مشاهده شد، ولی افزایش پارامترهای فوق در گروه تیماری همزمان با بیس‌فنل‌آ و زنجبیل نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود (P> ۰/۰۵) (جدول شماره ۵).

سنجش میزان مالون دی آلدئید و تستوسترون سرم افزایش معنی‌داری در سطوح MDA سرم در گروه بیس‌فنل‌آ در مقایسه با گروه کنترل یافت شد (P<۰/۰۰۱). میانگین میزان مالون‌دی‌آلدئید سرم در گروه تیماری همزمان بیس‌فنل‌آ و زنجبیل نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵). ولی کاهش معنی‌داری در میزان تستوسترون سرم در گروه بیس‌فنل‌آ نسبت به گروه کنترل یافت شد. (P<۰/۰۰۱). در حالی که در گروه تیماری همزمان بیس‌فنل‌آ و زنجبیل نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (جدول شماره ۶).

در بیضه موش‌های گروه کنترل لوله‌های منی‌ساز اسپرماتوژنز طبیعی داشته، اپیتلیوم زایشی لوله‌ها شکل طبیعی خود را حفظ کرده (شکل شماره ۱-A). در بیضه موش‌های گروه بیس‌فنل‌آ آتروفی لوله‌های منی‌ساز، افزایش وسعت بافت بینابینی به همراه ادم بافتی و کاهش اسپرماتوژنز دیده شد. در این گروه ارتفاع اپیتلیوم زایشی نسبت به سایر گروه‌ها کاهش یافته و پیوستگی آن تا حدودی از دست رفته بود. در بعضی قسمت‌های لوله منی‌ساز آثاری از واکئول‌زایی در اپیتلیوم مشاهده شد (شکل شماره ۱-B). بیضه موش‌های گروه بیس‌فنل‌آ + زنجبیل نشان داد که اکثر تغییرات تخریبی و بی‌نظمی‌های ایجاد شده توسط بیس‌فنل‌آ با تجویز زنجبیل برگشت و تعدیل یافته بود. به طوری که اپیتلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز دارای ساختار طبیعی بوده و اسپرماتوژنز طبیعی داشتند (شکل شماره ۱-C).

جدول شماره ۵- مقایسه میانگین ضریب سلول سرتولی، ضریب میوزی، ضریب اسپرمیوژنز و تمایز لوله‌ای در گروه‌های مختلف موش ۳۴ روز پس از تیمار با بیس‌فنل‌آ (۲۴۰ mg/kg/day) و زنجبیل (۵۰۰ mg/kg/day)

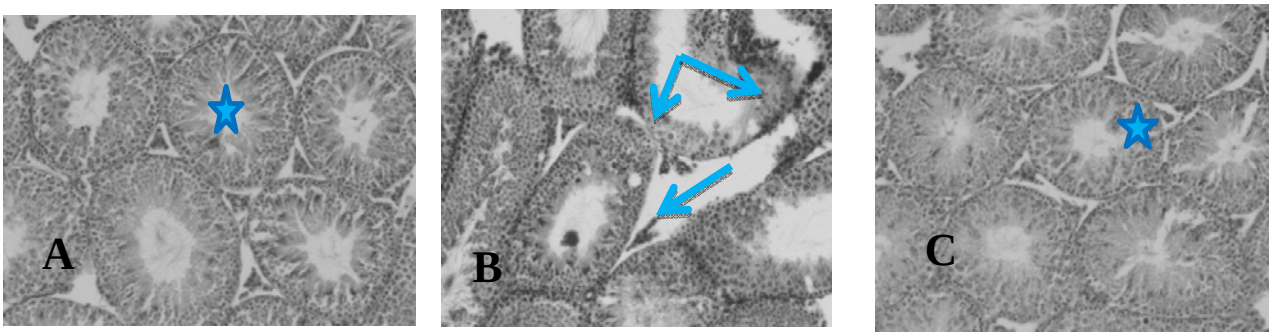
گروه‌ها	ضریب سلول سرتولی	ضریب میوزی	ضریب اسپرمیوژنز	ضریب تمایز لوله‌ای
کنترل	۹/۲۹ ± ۰/۷۳	۳/۷۸ ± ۰/۱۱	۸۹/۷۷ ± ۲/۰۶	۹۰/۶۸ ± ۱/۶۰
بیس‌فنل‌آ	۸/۸۰ ± ۱/۲۹	۳/۵۴ ± ۰/۲۴	۶۸/۳۳ ± ۸/۸۹ a	۷۱/۳۱ ± ۴/۰۳b
بیس‌فنل‌آ + عصاره زنجبیل	۹/۸۶ ± ۱/۵۱	۳/۹۹ ± ۰/۸۲	۸۲/۶۷ ± ۵/۹۳	۸۵/۷۹ ± ۱/۵۴
عصاره زنجبیل	۱۰/۱۷ ± ۰/۹۴	۳/۶۴ ± ۰/۲۴	۸۵/۸۲ ± ۴/۷۹	۸۷/۷۲ ± ۴/۰۵

a و b مقایسه آماری بیس‌فنل‌آ نسبت به گروه کنترل که به ترتیب (P< ۰/۰۰۲)، (P<۰/۰۰۱)

جدول شماره ۶- سنجش میزان مالون دی آلدئید و تستوسترون سرم

گروه	میزان مالون دی‌آلدئید	تستوسترون
کنترل	۵/۳۸ ± ۰/۴۴	۲/۱۱ ± ۰/۳۸
بیس فنل‌آ	۶/۷۱ ± ۰/۳۷a	۱/۰۵ ± ۰/۱۵a
بیس‌فنل‌آ + زنجبیل	۶/۷۱ ± ۰/۳۷	۲/۰۸ ± ۰/۲۹
عصاره زنجبیل	۳/۵۸ ± ۰/۵۱	۲/۱۱ ± ۰/۳۸

a مقایسه آماری بیس‌فنل‌آ نسبت به گروه کنترل (P<۰/۰۰۱)



شکل شماره ۱- تصاویر میکروسکوپی از بافت بیضه موش‌های بالغ در گروه‌های مختلف، تیمار شده با بیس فنل‌آ mg/kg/day (۲۴۰) و عصاره زنجبیل (ml/kg/day ۵۰۰)، (برش‌های ۵ میکرومتری، رنگ‌آمیزی هایدن هان آزان، بزرگنمایی ۲۰۰×) نشان‌دهنده: A) آرایش طبیعی اپیتلیوم زایشی در گروه کنترل (ستاره). B) کاهش ارتفاع اپیتلیوم زایشی، تخریب اسپرماتوژنز، بی‌نظمی و واکوئله شدن اپیتلیوم زایشی (نوک پیکان) و افزایش در فضای بین توبولی در گروه تیمار شده با بیس‌فنل‌آ. C) آرایش تقریباً طبیعی اپیتلیوم زایشی و اسپرماتوژنز طبیعی (ستاره) در گروه تیمار شده با بیس‌فنل‌آ به همراه عصاره زنجبیل

بحث

در این بررسی تیمار موش‌های بالغ نژاد (NMRI) با بیس‌فنل‌آ در دوز mg/kg/day ۲۴۰ به مدت ۳۴ روز باعث کاهشی در وزن بیضه، حجم بیضه، حجم لوله‌های منی‌ساز، قطر، ارتفاع لوله‌های منی‌ساز شد. همچنین در همین دوره تیمار تعداد اسپرماتوسیت، اسپرماتید گرد و دراز و سرتولی کاهش یافت.

بیس‌فنل‌آ باعث افزایش سطح رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپید وکاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز وگلوتاتیون در بافت بیضه می‌شود. بافت بیضه به دلیل دارا بودن درصد بالای اسیدهای چرب غیراشباع در غشاء سلول‌هایش و درجه بالای متابولیسم و تکثیرسلولی در این بافت به استرس اکسیداتیو بسیار حساس می‌باشد [۲۷] و همین دلایل باعث کاهش پارامترهای مورد مطالعه در این آزمایش بود.

بیس‌فنل‌آ به ارتباطات بین سلول‌های سرتولی در مناطق gap junction آسیب می‌رساند و از طریق کاهش دادن پروتئین کانکسین ۴۳ و فسفریلاسیون آن منجر به بی‌ثباتی غشاء سلول‌های سرتولی و جنسی (سدخونی- بیضه‌ای) می‌شود [۲۸].

نتایج مطالعه ما کاهش معنی‌داری را در قطر و ارتفاع اپی‌تلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز نشان داد. در مطالعه‌ای که یان (Yan) و همکارنش در سال ۲۰۰۹ بر روی موش‌های نر بالغ که با دوزهای mg/kg/day ۹۶۰، ۴۸۰، ۱۶۰ از بیس‌فنل‌آ از روز ۳۱ بعد از تولد تا روز ۴۴ تحت تیمار قرار گرفتند، صورت گرفت؛ در دوزهای بالای بیس‌فنل‌آ آتروفی و کاهش قطر لوله‌های منی‌ساز مشاهده شد [۲۹].

در بررسی دیگری که توسط تاکاهاشی (Takahashi) و همکارانش در سال ۲۰۰۳ برروی رت‌های نر نژاد ویستار، با دوز mg/kg/day ۲۰۰ بیس‌فنل‌آ به مدت ۳۰ روز انجام شد، اپیتلیوم‌زایشی لوله‌های منی‌ساز دژنره و به دنبال آن کاهش تولید اسپرم صورت گرفت [۳۰].

در پژوهشی که اثر عصاره زنجبیل را بر روی بافت بیضه رت بررسی کردند، نتایج نشان داد که عصاره زنجبیل مانع از تولید رادیکال‌های آزاد شده است و همچنین از طریق حفظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز، پراکسیداسیون لیپیدی را به طور قابل توجهی کاهش داده و حتی موجب افزایش تعداد اسپرم نسبت به گروه کنترل شده است [۱۰].

در یک مطالعه گزارش شد که کاهش در سطح GSH و آنزیم‌های متابولیزه‌کننده آن نقص اصلی را در برابر آسیب سلولی القاء شده با ROS ایجاد می‌کند(۳۱). در نتیجه کمبود GSH، تعدادی از عملکردهای مرتبط با آن ممکن است آسیب ببیند مثل کاهش در ظرفیت احیاء، بیوسنتز پروتئین، عملکرد ایمنی،

انباشتگی محصولات پرکسیداسیون لیپید و ظرفیت دفع سموم، که همگی می‌تواند عوارض نامطلوبی را بر بافت بیضه ایجاد کند [۳۲].

محققین آتروفی لوله‌های منی‌ساز را ناشی از کاهش سلول‌های جنسی و آپوپتوزیس آنها می‌دانند [۲۰].

ساکایو (Sakaue) و همکارانش در سال ۲۰۰۱ رت‌های نر بالغ را با بیس‌فنل‌آ در دوزهای mg/kg/day ۲۰۰، µg/kg/day ۲۰ به مدت ۶ روز به صورت دهانی تیمار کردند، در دوز پایین µg/kg/day ۲۰ اختلال در روند اسپرماتوژنز و کاهش تعداد اسپرم‌ها مشاهده شد و این نشان دهنده این است که دوز پایین باعث کند شدن روند اسپرماتوژنز می‌شود [۳۳].

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره زنجبیل توانسته است اثر بیس‌فنل‌آ برکاهش حجم کل بیضه و لوله‌های منی‌ساز را جبران کند. عصاره زنجبیل با دارا بودن اجزایی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی مثل جینجرون، شوگول و زینجیبرون می‌تواند سیستم آنتی‌اکسیدانی را تقویت و رادیکال‌های آزاد را حذف کندو به عنوان آنتی‌اکسیدان بر روی بیضه، غدد ضمیمه مانند، وزیکول سمینال، اسپرم و اپیدیدیم اثر می‌گذارد و از اثرات استرس اکسیداتیو جلوگیری می‌کند [۱۰].

در کل با توجه به نتایج محققین می‌توان چنین گفت که کاهش سلول‌های اسپرماتوسیت، اسپرماتید گرد و دراز و سرتولی به دلایل زیر می‌باشد. ۱) به هم خوردن تعادل هورمون‌های جنسی ۲) سلول‌های جنسی در محیط ایجاد شده بوسیله سلول‌های سرتولی زندگی می‌کنند [۳۴]. پس با از بین رفتن سلول‌های سرتولی شرایط مناسب برای زندگی سلول‌های جنسی نیز از بین می‌رود. ۳) افزایش آپاپتوزیس ۴) القاء استرس اکسیداتیو.

در این مطالعه در گروه‌هایی که همزمان با بیس‌فنل‌آ، عصاره زنجبیل را دریافت می‌کردند کاهش قطر لوله‌های منی‌ساز، ارتفاع اپیتلیوم زایشی، تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت، اسپرماتید گرد و دراز و سرتولی تا حدودی در حد گروه کنترل جبران شد.

در این مطالعه ضریب تمایز لوله‌ای و ضریب اسپرمیوژنز در گروه بیس‌فنل‌آ نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. هرگونه تغییر در سلول‌های سرتولی می‌تواند منجر به القای ناهنجاری در اسپرماتوژنز و اسپرمیوژنز شود [۳۵]. کاهش ضریب تمایز لوله‌ای و کاهش ضریب اسپرمیوژنز در مطالعه حاضر به علت کاهش روند اسپرماتوژنز یا کاهش سلول‌های جنسی می‌باشد.

در مطالعه حاضر میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در گروه‌های مختلف مقایسه شد. نتایج افزایش معنی‌دار MDA را در گروه بیس‌فنل‌آ نسبت به گروه کنترل نشان داد. در مطالعه Morad و همکارانش در سال ۲۰۱۲ رت‌ها با بیس‌فنل‌آ در دوزهای mg/kg/day ۲۵، ۱۰ به مدت ۶ هفته از طریق گاواژ دهانی تیمار شدند [۳۶] که افزایش معنی‌داری در سطح مالون‌دی‌آلدئید در گروه بیس‌فنل‌آ نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. میزان ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدی نشان می‌دهد که بیس‌فنل‌آ تولید مالون‌دی‌آلدئید را افزایش می‌دهد و با قرارگرفتن سلول در معرض بیس‌فنل‌آ تولید رادیکال‌های آزاد از میتوکندری افزایش می‌یابد. بیس‌فنل‌آ باعث غیرفعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود ولی عصاره زنجبیل باعث فعال شدن این آنزیم‌ها و کاهش استرس‌اکسیداتیو می‌شود.

موراکینیو (Morakinyo) و همکارانش در سال ۲۰۰۸ عصاره زنجبیل را در دوزهای mg/kg/day ۱۰۰، ۵۰۰ به رت‌های نر بالغ از طریق گاواژ تیمار کردند، مشاهده کردند که سطح MDA در گروه عصاره زنجبیل نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت [۱۰] که با نتیجه این مطالعه هم راستا است. بنابراین اثرات حفاظتی زنجبیل را می‌توان ناشی از اثر آنتی‌اکسیدانی قوی آن دانست که به شدت موجب کاهش استرس اکسیداتیو می‌شود.

در این مطالعه میزان تستوسترون در گروه‌های مختلف مقایسه شد نتایج کاهش معنی‌دار تستوسترون را در گروه بیس‌فنل‌آ نسبت به گروه کنترل نشان داد ولی عصاره زنجبیل در گروه تیماری همزمان بیس‌فنل‌آ و زنجبیل باعث افزایش تستوسترون تا حد گروه کنترل شد. در تأیید این مطلب شارما (Sharma) و همکارانش در مطالعه خود نشان دادند که کاهش تستوسترون و FSH در اثر بیس‌فنل‌آ باعث توقف میوز اسپرماتوسیت‌ها و در نهایت کاهش تعداد سلول‌های جنسی می‌شود [۳۷] بنابراین تغییر در سطح این هورمون رابطه‌ای مثبت در کاهش قطر لوله‌های منی‌ساز در موش‌های تیمار شده

با بیس‌فنل‌آ دارد. در مطالعه دیگری توسط نورازیت (Norazit) و همکارانش در سال ۲۰۱۲ رت‌ها را با بیس‌فنل‌آ در دوز mg/kg/day ۱۰۰ به مدت ۲۲ تا ۴۴ روز از طریق گاواژ دهانی تیمار دادند [۳۸] که کاهش معنی‌داری در سطح تستوسترون سرم در گروه بیس‌فنل‌آ نسبت به گروه کنترل مشاهده شد.

در مطالعه‌ای توسط والا (Walaa) و همکارانش در سال ۲۰۱۴ عصاره زنجبیل را در دوز mg/kg/day ۱۰۰ به رت‌های نر بالغ از طریق گاواژ تیمار دادند، مشاهده کردند که عصاره زنجبیل باعث افزایش سطح تستوسترون تا حد گروه کنترل می‌شود [۳۹].

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این پژوهش بیس‌فنل‌آ قادر به القاء سمیت در بافت بیضه موش می‌باشد. نتایج ما کاهش در حجم کل بیضه و حجم لوله‌های منی‌ساز، کاهش قطر، ارتفاع اپیتلیوم زایشی و همچنین کاهش در تعداد اسپرماتوسیت‌ها، اسپرماتیدها، سرتولی، ضریب تمایز لوله‌ای و ضریب اسپرمیوژنز را در موش‌های تیماری با بیس‌فنل‌آ نشان داد، و عصاره زنجبیل در گروه بیس‌فنل‌آ+ عصاره زنجبیل تا حدودی باعث بهبود پارامترهای فوق نسبت به گروه کنترل شد. همچنین در این مطالعه بیس‌فنل‌آ باعث افزایش تستوسترون و افزایش غلظت مالون‌دی‌آلدئید سرم شد. عصاره زنجبیل نیز با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی خود توانست اثرات سوء بیس‌فنل‌آ را بر بافت بیضه در این مطالعه کاهش دهد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم عاطفه حسنوند 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. Neamtu M and Frimmel FH. Degradation of endocrine disrupting Bisphenol A by 254 nm irradiation in different water matrices and effect on yeast cells. *Water Res.* 2006; 40: 3745 - 50.

2. Iravani E, Dehghani MH, Mahvi AH and Rastkari N. Removal of Bisphenol A from aqueous solutions using Single walled carbon nanotubes: Investigation of adsorption isotherms. *Iranian Journal of Health and Environment* 2013; 6: 257 - 264.

3. Vandenberg LN, maffini MV, sonnenschein C, Rubin BS and Soto AM. Bisphenol-A and great divide: areview of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr. Rev.* 2009; 30: 75-95.

4. Markey CM, Luque EH, Muno ZM, Sonnenschein C and Soto AM. In utero exposure to bisphenol-A alters the development and tissue organization of the mouse mamery gland. *Biol. Reprod*. 2001; 65 (4): 1215 - 23.

5. Elshaari FA, Fatum AE, Sheriff DS. Spermatozoa-an unique representation of oxygen-antioxidant paradox. *Acta Medica Medianae* 2010; 49: 48 - 53.

6. Ohara M, Kiefer D, Farrell K and Kemper K. Areview if 12 commonly used medicinal herbs. *Arch. Fam. Med*. 1998; (7): 523 - 36.

7. Dalia AH. Effect of extracts of ginger roots and cinnamon bark on fertility of male diabetic rats Rats. *Journal of American Science* 2010; 6 (10): 940 - 947.

8. Afshari AT, Shirpoor A, Saadation R, Rasmi Y, Saboory E et al. The effect of ginger on diabetic nephropathy,plasma antioxidant capacity and lipid

peroxidation in rats. *Food Cheam*. 2007; 110: 148 - 530.

9. Rehab MH and Jehane IE. Pathological mechanisms of liver injury caused by oral administration of bisphenol A. *Life Science J.* 2013; 1 (1): 663 - 73.

10. Morakinyo AO, Adeniyi OS and Arikawe AP. Effects of *zingiber officinale* on reproductive functions in the male rat. *African Journal Biomedical Res.* 2008; 11: 329 - 34.

11. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An. Acad. Bras. Cienc*. 2003**;** 75: 469 - 86.

12. Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H and 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: 524 - 33.

13. Howard C and Reed M. Unbiased Stereology: Three-DimentionalMeasurment in Microscopy. *J. Anat*. 1999; 194 (Pt 1): 153 - 157.

14. Noorafshan A, Karbalay-Doust S, Valizadeh A, et al. Ameliorative effects of curcumin on the seminiferous epithelium in metronidazole-treated mice: A stereological study. *Toxicologic Pathol*. 2010; 38: 366 - 71.

15. Kierna JA. Histopathology & Histochimical Methods; Theory & Practic 3rd edition. Oxford: Butternworth-Heinemann, 1999, pp: 1 - 502.

16. Hoseini L, Roozbeh J, Sagheb M, Karbalay-Doust S and Noorafshan A. Nandrolonedecanoate increases the volume but not the length of the proximal and distal convoluted tubules of the mouse kidney. *Micron*. 2009; 40: 226 - 30.

17. Soleimani Mehranjani M and Mahmoudi M. Stereological study of the effects of vitamin E on testis structure in rats treated with para-nonylphenol. *Asian J. Androl.* 2009; 11: 508 - 516.

18. 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. *J. Pharmacol. Toxicol*. 2002; 90: 59 - 65.

19. Ferrando RE, Nyengaard JR, Hays SR, Fahy JV and Woodruff PG. Applying stereology to measure thickness of the basement membrane zone in bronchial biopsy specimens. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2003; 112: 1243 - 45.

20. Peng B, Zhang RD, Dai XS, Deng XZ, Wan Y and et al .Quantitative (stereological) study of the effects of vasectomy on spermatogenesis in rhesus monkeys (Macacamulatta). *Reproduction* 2002; 124: 847 - 56.

21. Porter KL, Shetty G and MeistrichML. Testicular edema is associated with spermatogonial arrest in irradiated rats. *Endocrinol*. 2006; 7: 1297 - 305.

22. Rezvanfar MA, Sadrkhanlou RA, Ahmadi A, Shojaei-Sadee H, Mohammadirad A, Salehnia A and Abdollahi M. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. *Hum. Exp. Toxicol*. 2008; 27 (12): 901 - 10.

23. Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP and Clegg ED. Histological and histopathological evaluation of the testis, Cache River Press, Clearwater, *Florida*. 1990; 62 - 193.

24. Kheradmand A , Dezfoulin O and Tarrahi M J. Ghrelin attenuates heat-induced degenerative effects in the rat testis. *Regulatory Peptides* 2011; 167: 97 - 104.

25. Esterbauer H and Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 407 - 21.

26. Afify M, Abd Elmaksoud M, Mosa T, Elshaer M and Kotb N. Differential affects of amitriptyline treatment on testicular and liver functions in adult male rats. *New York Science J*. 2010; 3: 10 - 18.

27. Elshaari FA, Fatum AE and Sheriff DS. Spermatozoa-an unique representation of Oxygen-Antioxidant paradox. *Acta Medica Medianae* 2010;

49: 48 - 53.

28. Toyama Y and Yuassa S. Effects of bneonatal administration of 17 beta estradiol, beta estradiol 3 benzoate or BPAon mouse and rat spermatogenesis. *Reprod. Toxicol*. 2004; 19: 181 - 88.

29. Yang Yj, Lee SY, Kim KY and Hong YP. Acute Testis Toxicity of Bisphenol A Diglycidyl Ether in Sprague-Dawley(SD) Rats. 2010; 43:131 - 7.

30. Takahashi O and Oishi S. Testicular toxicity of dietarily or parenterally administered bisphenol A in rats and mice. *Food and Chemical Toxicol*. 2003; 41: 1035 - 44.

31. Celik I and Suzek H. Subacute effects of methyl parathion on antioxidant defense systems and lipid peroxidation in rats. *Food Chem. Toxicol. Aug*. 2008; 46 (8): 2796 - 801.

32. Karafakioglu YS and Aslan R. Taurine Prevents Nonylphenol-Induced Oxidative Stress in Rats. *J. Animal and Veterinary Advances* 2010; 9: 37 - 43.

33. Sakaue M, Ohsako S, Ishimura R, Kurosawa S and Kurohmaru M. Bisphenol-a affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. *J. Occup. Health* 2001; 43: 185 - 90.

34. Boekelheide K, Fleming SL, Johnson KJ, Patel SR and Schoenfeld HA. Role of Sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 2000; 225: 105 - 15.

35. Hosseini A, Ahmadi A, GhaderiPakdel F and Zare S. Effects of chronic low- dose treatment with cyclophosphamide on the rat testis. *Physiol. Pharmacol*. 2011; 15 (3): 351 - 60.

36. Mourad IM and Khadrawy YA. The sensitivity of liver, kidney and testis of rats to oxidative stress induced by different doses of bisphenol A. 2012, p: 2.

37. Sharma P and Kalita JC. Estrogenic effects of bisphenol-A and octylphenol on reproductive health of male albino mice. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* 2013; 4: 188 - 94.

38. Norazit A, Mohamad J, Razak S, Abdulla M and Azmil A. Effects of soya bean extract, bisphenol a and 17β-Estradiol on the testis and circulating levels of testosterone and estradiol among peripubertal juvenile male Sprague-Dawley rats. *Sains Malaysiana* 2012; 41: 63 - 69.

39. Walaa GH. Hanan AS and Howida SA. Study of the chemopreventive effects of *zingiber officinale* roots against aspartame induced testicular toxicity in rat model. *J. Phys. Pharm. Adv*. 2014; 4 (5): 360 - 7.