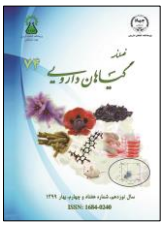
فصلنامه گیاهان دارویی ۱۳۹۹؛ ۱۹(۷۴): ۶۳-۷۲

فصلنامه گیاهان دارویی

Journal homepage: www.jmp.ir

پژوهشکده گیاهان دارویی
جهاد دانشگاهی



مقاله تحقیقاتی

اثر عصاره چای سبز بر پارامترهای سلامت اسپرم رت‌های بالغ تیمار شده با بیسفنول A

سیدمحمدعلی شریعت‌زاده، ملک سلیمانی مهرنجانی، سمانه تقی‌پور*، آتنا سادات عظیمی

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

اطلاعات مقاله

گل‌واژگان:
بیسفنول A
عصاره چای سبز
پارامترهای سلامت اسپرم

چکیده

مقدمه: بیسفنول A (BPA) از طریق تولید رادیکال‌های آزاد، عملکرد دستگاه تناسلی مردان را مختل می‌کند. از سوی دیگر، عصاره چای سبز (GTE) به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی شناخته می‌شود. **هدف:** هدف از این مطالعه بررسی اثر تیمار همزمان بیسفنول A و GTE به عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدانی بر عملکرد دستگاه تناسلی مردان بود. **روش بررسی:** رت‌های نر بالغ به ۴ گروه تقسیم شدند: کنترل، بیسفنول A (۲۰ µg/kg/day)، GTE (۱۰۰ mg/kg/day) و بیسفنول A + GTE و برای ۸ هفته تیمار شدند. وزن بدن و وزن بیضه چپ ثبت شد و سپس ناحیه دمی اپیدیدیم چپ نیز در محیط کشت Ham's F10 به چند قطعه برش داده شد. اسپرم‌های خارج شده به منظور بررسی تعداد، تحرک، قابلیت حیات و ناهنجاری‌های مورد بررسی قرار گرفتند. کیفیت کروماتین اسپرم، توسط رنگ‌آمیزی‌های هسته‌ای آکریدین اورانژ و آنیلین بلو بررسی شد. داده‌ها با روش آماری واریانس یک‌طرفه و تست Tukey تجزیه و تحلیل و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. **نتایج:** کاهش معنی‌داری در تعداد، تحرک و قابلیت حیات اسپرم در گروه بیسفنول A در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. بیسفنول A بر کیفیت DNA اسپرم و جایگزینی پروتامین به جای هیستون هیچ اثری نداشت. همچنین افزایش قابل توجهی در قابلیت حیات و تحرک اسپرم، در گروه عصاره چای سبز در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره چای سبز می‌تواند اثرات نامطلوب بیسفنول A بر سلامت اسپرم در رت‌های بالغ را کاهش دهد.

۱. مقدمه

Bisphenol A، یک شبه استروژن محیطی است که به عنوان مونومر در ساخت برخی پلاستیک‌ها (پلی‌کربنات‌ها و اپوکسی رزین) و به طور وسیعی در تولید انواع مواد و وسایل از جمله مواد پرکننده دندان، ظروف یک بار مصرف و پوشش‌های داخلی قوطی‌های کنسرو به کار می‌رود [۲، ۱]. این ماده به دلیل داشتن اثرات استروژنی بر سیستم تولید مثل، جزء مخرب‌های اندوکرینی طبقه‌بندی می‌شود، که اثرات نامطلوبی در موجودات برجای می‌گذارد، از جمله تغییر در عملکرد غدد درون‌ریز یا تأثیر بر تولیدمثل که با

مخففها: BPA، بیسفنول A؛ GTE، عصاره چای سبز؛

* نویسنده مسؤول: Samanetaghipor@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۶ مرداد ۱۳۹۶؛ **تاریخ دریافت اصلاحات:** ۲۲ مرداد ۱۳۹۷؛ **تاریخ پذیرش:** ۲۹ آبان ۱۳۹۷

doi: 10.29252/jmp.19.74.63.

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

تقلید عمل هورمون‌های جنسی و تیروکسین اثرات خود را نشان می‌دهد [۳]. کاهش باروری مردان، سرطان پروستات و بیضه، ناهنجاری تکامل جنسی، تغییر در عملکرد غدد هیپوفیز و تیروئید، سرکوب ایمنی و اثرات عصبی رفتاری تا حدی به این ماده نسبت داده می‌شود [۴]. مداخله آن با فعالیت اندروژن‌ها در طی تکامل و ایجاد استرس اکسیداتیو منجر به ناهنجاری دستگاه تناسلی مردانه می‌شود که کاهش ظرفیت تولید اسپرم را به دنبال دارد [۵].

عصاره چای سبز حاوی مقادیر زیادی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی پلی فنلی بویژه کاتچین است که به سرعت جذب بدن شده و خواص ضد سرطانی، ضد میکروبی و ضد التهابی آن اثبات شده است. در برگ‌های چای سبز چهار نوع کاتچین وجود دارد که شامل اپی کاتچین، اپی گالوکاتچین، اپی کاتچین گالات و اپی گالوکاتچین گالات است [۶] که در این میان خاصیت آنتی‌اکسیدانی اپی گالوکاتچین گالات ۱۰۰ – ۲۵ مرتبه از ویتامین‌های E و C قوی‌تر است [۷]. چای سبز به علت غنی بودن پلی‌فنل‌ها به عنوان آنتی‌اکسیدان قوی باعث مهار اکسیژن واکنش‌پذیر و گونه‌های نیتروژن می‌شود که درنهایت موجب افزایش کیفیت اسپرم می‌شود [۸]. با توجه به اثرات سمی Bisphenol A مبنی بر القا استرس اکسیداتیو در دستگاه تناسلی نر و خواص عصاره چای سبز به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی، فرض شد که عصاره چای سبز قادر است اثرات مخرب این آلاینده زیست محیطی را خنثی نماید. بنابراین این پژوهش با هدف بررسی نقش عصاره چای سبز بر اثرات Bisphenol A بر روی فاکتورهای اسپرم رت بالغ طراحی شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. *حیوانات و تیمارها*

در این پژوهش تجربی از رت‌های نر بالغ نژاد ویستار با میانگین وزنی۱۰ ± ۲۰۹ گرم که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بودند، استفاده شد. حیوانات در قفس‌های پلاستیکی در اتاق حیوانات با درجه حرارت ۲ ± ۲۱ درجه سانتی‌گراد و نور کنترل شده ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی با دسترسی کامل به آب و غذای کافی نگهداری شدند. در این پژوهش کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است. رت‌های بالغ در ۴ گروه تقسیم شدند (در هر گروه ۶ حیوان): گروه کنترل (تیمار با آب)، عصاره چای سبز (۱۰۰ mg/kg/day)، بیسفنول A (۲۰µg/kg/day) و بیسفنول A + عصاره چای سبز.

تیمارها به صورت خوراکی و بوسیله گاواژ روزانه انجام شد، از آنجا که یک دوره اسپرماتوژنز رت ۵۲ روز می‌باشد تیمار به مدت ۸ هفته صورت گرفت [۹].

۲.۲. *وزن بدن و بیضه*

در پایان دوره تیمار، وزن حیوان‌ها ثبت شد، سپس بوسیله اتر بیهوش و سرانجام کشته شدند. پس از خروج بیضه چپ، این اندام از چربی تمیز و وزن آن ثبت شد. سپس ناحیه دمی اپیدیدیم چپ جدا شد تا جهت آنالیزهای اسپرم که در زیر به آن اشاره شده است، مورد استفاده قرار گیرد.

۳.۲. *شمارش اسپرم*

اپیدیدیم خارج شده از هر حیوان به پلیت حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت Ham's F10 انتقال یافت و به منظور خروج اسپرم‌ها به درون محیط کشت به قطعات کوچکی بریده شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه، یک میلی‌لیتر از مخلوط محیط کشت و اسپرم با ۹ میلی‌لیتر فرمالین ۲ درصد رقیق و فیکس شد. شمارش تعداد اسپرم با استفاده از هموسیتومتر نئوبار انجام گرفت و سپس تعداد اسپرم‌ها در میلی‌لیتر محاسبه شد. شمارش اسپرم بر اساس دستورالعمل ارائه شده از طرف سازمانی جهانی بهداشت (World Health Organization-WHO) انجام شد [۹].

۴.۲. قابلیت تحرک اسپرم

سنجش حرکات اسپرم بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط WHO انجام شد [۱۱]. به طور خلاصه ۱۰ میکرولیتر مخلوط محیط کشت و اسپرم بر روی لام نئوبار قرار گرفت. حداقل ۵ میدان میکروسکوپی جهت ارزیابی حرکت حداقل ۲۰۰ اسپرم از هر نمونه مورد بررسی قرار گرفت. سپس درصد سه نوع طرح حرکتی در اسپرم شامل اسپرم‌های با حرکت پیش رونده، اسپرم‌های با حرکات درجا و اسپرم‌های غیرمتحرک محاسبه شد.

۵.۲. قابلیت حیات اسپرم

به منظور بررسی قابلیت حیات اسپرم‌های هر گروه بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط WHO [۱۰] و رنگ آمیزی ائوزین- نکروزین انجام شد. به طور خلاصه، ائوزین (۱ درصد، مرک، آلمان) و نکروزین (۱۰ درصد، مرک، آلمان) در آب مقطر آماده شد. ابتدا یک حجم مخلوط محیط کشت و اسپرم با دو حجم ائوزین مخلوط شد و پس از گذشت زمان ۳۰ ثانیه نگهداری در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حجم مساوی از نکروزین به مخلوط ساخته شده (اسپرم و ائوزین) اضافه شد. سپس گسترش‌های نازکی از مخلوط تهیه و پس از خشک شدن در دمای آزمایشگاه توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ×۱۰۰ تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش و نسبت درصد اسپرم در گروه‌های مختلف محاسبه شد. در این رنگ‌آمیزی سر اسپرم های زنده به رنگ سفید و سر اسپرم‌های مرده به رنگ قرمز ظاهر می‌شود.

۶.۲. مورفولوژی اسپرم

لامل‌های رنگ‌آمیزی شده بوسیله ائوزین- نکروزین جهت ارزیابی مورفولوژی اسپرم‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. برای هر نمونه تعداد ۲۰۰ اسپرم با بزرگنمایی ×۱۰۰ میکروسکوپ نوری بررسی و میزان ناهنجاری اسپرم به صورت درصد بیان شد.

۷.۲. کیفیت کروماتین اسپرم

ابتدا از مخلوط محیط کشت و اسپرم گسترش‌های نازکی بر روی لام تهیه و در درجه حرارت اتاق خشک شدند، جهت ارزیابی تمامیت DNA (DNA integrity) گسترش های اسپرم بوسیله آکریدین اورنژ رنگ‌آمیزی شد [۱۱]. به طور خلاصه گسترش‌ها در محلول فیکساتور متانول (۳ قسمت)/ اسید استیک گلاسیال (۱ قسمت) به مدت ۱ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد تثبیت و سپس با محلول آکریدین اورنژ (۰/۱۹ درصد در بافر سیترات فسفاته، pH=۲/۵) برای ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. لام‌ها بوسیله آب‌مقطر برای ۵ دقیقه به آرامی شستشو و سپس در دمای آزمایشگاه خشک شدند. سپس لام‌های رنگ‌آمیزی شده بوسیله میکروسکوپ فلورسنس با بزرگ‌نمایی ×۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند. سه طرح رنگ‌آمیزی شده در سرهای اسپرم مورد توجه قرار گرفت: اسپرم‌های با سر سبز بیانگر DNA دو رشته‌ای یا سالم (Double – stranded DNA) و اسپرم‌های با سر زرد و قرمز بیانگر DNA تک رشته‌ای یا دناتوره شده (Single – stranded DNA) هستند. در هر لام حداقل ۱۰۰ اسپرم شمارش شد تا درصد اسپرم‌های دو رشته‌ای و تک رشته‌ای تعیین شود. به منظور کنترل روش مذکور از نمونه‌های کنترل مثبت استفاده شد. بدین‌منظور نمونه‌های اسپرم از حیوان سالم و بالغ گرفته شد و سپس DNA این اسپرم‌ها تحت تأثیر حرارت بالا (۹۰ درجه سانتی‌گراد) دناتوره شد. پس از تهیه گسترش، نمونه‌ها به روش اشاره شده رنگ‌آمیزی شدند.

جهت تعیین میزان جایگزینی پروتامین به جای هیستون، گسترش‌های اسپرم با آنیلین بلو رنگ‌آمیزی شدند [۱۲]. به طور خلاصه، گسترش‌های اسپرم بوسیله محلول فرمالین ۴

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، pH= ۳/۵) رنگ‌آمیزی شد. سپس لام‌ها برای ۵ دقیقه در آب‌مقطر شستشو و سرانجام با محلول ائوزین ۰/۵ درصد برای یک دقیقه رنگ‌آمیزی شد. پس از خشک شدن، لام‌ها توسط میکروسکوپ معمولی با بزرگنمایی ×100 مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این روش سر اسپرم‌های نابالغ (واجد مقادیر زیاد هیستون) به صورت آبی پررنگ و سر اسپرم‌های بالغ (واجد پروتامین) به رنگ قرمز- صورتی ظاهر می‌شود. حداقل ۱۰۰ اسپرم در هر لام شمارش می‌شوند تا درصد اسپرم‌های بالغ و نابالغ تعیین شود.

۸.۲ آنالیز آماری

نتایج به صورت میانگین ± انحراف استاندارد برای نمونه های موجود در هر گروه بیان شد. جهت آنالیز آماری از آنالیز واریانس یک طرفه همراه با تست توکی استفاده شد و P< ۰/۰۵ به عنوان مرز معنی‌دار بودن نتایج در نظر گرفته شد.

۳. نتایج

۱.۳. وزن بدن و وزن بیضه چپ

میانگین وزن رت پس از اتمام دوره تیمار، در بین گروه های مختلف اختلاف معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵). از مقایسه میانگین وزن بیضه نیز پس از اتمام دوره تیمار در بین گروه‌های مختلف رت اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (جدول ۱).

۲.۳. ارزیابی قابلیت تحرک اسپرم

از مقایسه میانگین درصد اسپرم‌های جلورونده بین گروه کنترل و عصاره چای سبز تفاوت معناداری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). اما میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکت جلو رونده در گروه بیسفنول A نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری (P <۰/۰۰۱) نشان داد. از طرفی میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکت جلورونده در گروه عصاره چای سبز + بیسفنول A نسبت به گروه بیسفنول A افزایش معنی داری (P <۰/۰۰۱) داشت. به عبارت دیگر، در گروه عصاره چای سبز + بیسفنول A، عصاره چای سبز توانست اثرات مخرب بیسفنول A را درخصوص درصد اسپرم‌های جلورونده در مقایسه با گروه بیسفنول A به طور معنی‌داری جبران نماید.

از مقایسه میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکت درجا و ساکن بین گروه بیسفنول A با گروه کنترل و عصاره چای سبز افزایش معناداری (P <۰/۰۰۱) مشاهده شد. میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکت درجا و ساکن در گروه عصاره چای سبز + بیسفنول A نیز نسبت به گروه بیسفنول A کاهش معنی‌داری (P <۰/۰۰۱) نشان داد. به عبارت دیگر در گروه عصاره چای سبز + بیسفنول A، عصاره چای سبز توانست اثرات مخرب بیسفنول A را درخصوص افزایش درصد اسپرم های دارای حرکات درجا و ساکن در مقایسه با گروه بیسفنول A به طور معنی‌داری جبران نماید (جدول ۲).

۳.۳. بررسی تعداد اسپرم

میانگین تعداد اسپرم در گروه بیسفنول A نسبت به سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری (P <۰/۰۰۱) نشان داد. میانگین تعداد اسپرم در گروه عصاره چای سبز + بیسفنول A نسبت به گروه بیسفنول A افزایش معنادار نشان داد (جدول ۳).

۴.۳. ارزیابی قابلیت حیات اسپرم

میانگین درصد اسپرم‌های زنده که معادل قابلیت حیات اسپرم می‌باشد در گروه تیمار شده با بیسفنول A در مقایسه با سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری (P <۰/۰۰۱) یافت و در گروهی که همزمان با بیسفنول A، عصاره چای سبز دریافت

می‌کرد این کاهش به طور معنی‌دار و در حد گروه کنترل جبران شد (P<۰/۰۱). همچنین عصاره چای سبز افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۰۶) در میانگین قابلیت حیات اسپرم در مقایسه با دیگر گروه‌ها نشان داد (جدول ۳).

۵.۳. بررسی مورفولوژی اسپرم

میانگین درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم در رت‌ها پس از ۵۶ روز تیمار با بیسفنول A بین هیچ‌یک از گروه‌های چهارگانه اختلاف معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵) (جدول ۳).

۶.۳. ارزیابی تمامیت DNA

رنگ‌آمیزی گسترش‌های اسپرمی با آکردین اورانژ نشان داد که تیمار رت‌ها با بیسفنول A در مقایسه با گروه کنترل تأثیری بر دناتوره شدن ساختمان دو رشته‌ای DNA اسپرم ندارد (شکل 1a). برعکس نمونه‌های کنترل مثبت شامل اسپرم‌هایی که DNA آنها توسط حرارت بالا دناتوره شده بودند به رنگ نارنجی ظاهر شدند (شکل 1b).

جدول ۱. مقایسه میانگین وزن بیضه (گرم) و وزن رت (گرم) در گروه‌های مختلف رت، ۵۶ روز پس از تیمار با بیسفنول A (۲۰ µg/kg/day) و عصاره چای سبز (۱۰۰ mg/kg/day). مقادیر به صورت mean ± sd می‌باشد.

وزن بیسفنول A	کنترل	عصاره چای سبز	بیسفنول A	عصاره چای سبز + بیسفنول A
میانگین وزن رت در پایان تیمار (گرم)	۲۹۶ ± ۱۱/۶۸	۲۸۵ ± ۲۱/۹۷	۲۸۱ ± ۲۳/۸۰	۲۸۷ ± ۱۹/۵۰
میانگین وزن بیضه رت (گرم)	۱/۶۲ ± ۰/۱۰	۱/۵۶ ± ۰/۱۰	۱/۴۸ ± ۰/۰۷	۱/۴۹ ± ۰/۰۴

جدول ۲. مقایسه میانگین قابلیت تحرک اسپرم در گروه‌های مختلف رت، ۵۶ روز پس از تیمار با بیسفنول A (۲۰ µg/kg/day) و عصاره چای سبز (۱۰۰ mg/kg/day). مقادیر به صورت mean ± sd می‌باشد.

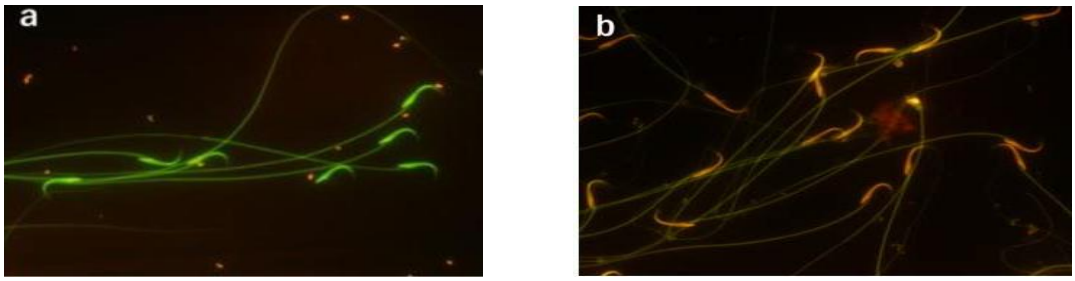
قابلیت تحرک اسپرم (درصد)	کنترل	عصاره چای سبز	بیسفنول A	عصاره چای سبز + بیسفنول A
جلورونده	۷۳/۸۳ ± ۴/۴۱ ^{c}	۷۶/۰۰± ۴/۲۹ ^{c}	۵۵/۰۰ ± ۳/۷۴^{a}	۶۸/۵۰ ± ۴/۴۶ ^{b}
درجا	۱/۵۰ ± ۱/۸۷ ^{a}	۱۷/۰۰ ± ۳/۴۰ ^{a}	۲۴/۶۷ ± ۳/۳۲ ^{b}	۱۹/۸۳ ± ۵/۰۷ ^{a}
ساکن	۱۰/۰۰ ± ۲/۸۲ ^{a}	۶/۰۰ ± ۳/۳۴^{a}	۲۱/۱۷ ± ۲/۷۰ ^{b}	۱/۷۰± ۲/۱۳ ^{a}

در هر ردیف میانگین‌ها با حروف متفاوت، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشد (P< ۰/۰۵ و One-way ANOVA, Tukey´s test).

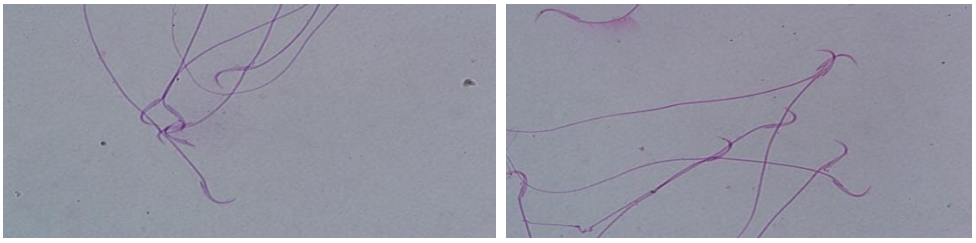
جدول ۳. مقایسه میانگین پارامترهای اسپرمی (تعداد، قابلیت حیات و مورفولوژی طبیعی اسپرم) در گروه‌های مختلف رت، ۵۶ روز پس از تیمار با بیسفنول A (۲۰ µg/kg/day) و عصاره چای سبز (۱۰۰ mg/kg/day). مقادیر به صورت mean ± sd می‌باشد.

پارامترهای اسپرم	کنترل	عصاره چای سبز	بیسفنول A	عصاره چای سبز + بیسفنول A
تعداد ($۱۰^{۶}$)	۲۴/۲۰ ± ۲۷/۱۵ ^{a}	۲۵/۲۰ ± ۲۶/۴۵ ^{a}	۱۳/۵۰± ۲۵/۷۵ ^{b}	۲۲/۲۰ ± ۲۴/۴۰ ^{a}
قابلیت حیات (درصد)	۷۰/۵۰ ± ۳/۸۳^{a}	۷۸/۸۳ ± ۳/۰۶^{a}	۵۶/۶۷ ± ۴/۷۶ ^{b}	۶۷/۳۳ ± ۳/۵۰^{a}
مورفولوژی طبیعی (درصد)	۸۶/۸۳ ± ۲/۳۱^{a}	۸۶/۶۷ ± ۲/۱۶^{a}	۸۳/۵۰ ± ۲/۷۲^{a}	۸۵/۵۰ ± ۱/۸۷^{a}

در هر ردیف میانگین‌ها با حروف متفاوت، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشد (P< ۰/۰۵ و One-way ANOVA, Tukey´s test).



شکل ۱. ارزیابی تمامیت DNA در اسپرم رت. a) اسپرم‌های با سر سبز رنگ نشان‌دهنده DNA طبیعی و دست نخورده در گروه تیمار شده با بیسفنول A (۲۰ µg/kg/day) به مدت ۵۶ روز می‌باشد. b) نمونه کنترل مثبت اسپرم‌های با سر نارنجی بیانگر اسپرم‌هایی است که DNA آنها توسط حرارت بالا دناتوره شده است. رنگ‌آمیزی آکریدین اورانژ، بزرگنمایی ۱۰۰x.



شکل ۲. ارزیابی جایگزینی پروتامین به جای هیستون در کروماتین اسپرم رت. اسپرم‌های با سر قرمز– صورتی (red-pink) بیانگر اسپرم‌های بالغ واجد پروتامین هسته‌ای در گروه تیمار شده با بیسفنول A (۲۰ µg/kg/day) به مدت ۵۶ روز می‌باشد. رنگ آمیزی آنلین بلو، بزرگنمایی ۱۰۰x.

۳.۷. ارزیابی اسپرم‌های بالغ ونابالغ

رنگ‌آمیزی گسترش‌های اسپرمی با آنلین بلو بیانگر این بود که تیمار رت‌ها با بیسفنول A در مقایسه با کنترل تأثیری بر جایگزینی هیستون با پروتامین در هسته طی فرآیند بلوغ اسپرم نداشته است (شکل ۲).

۴. بحث

در این پژوهش کاهش معناداری در تعداد، تحرک، قابلیت حیات اسپرم در گروه بیسفنول A در مقایسه با سایر گروه‌ها مشاهده شد. بیسفنول A تأثیری بر کیفیت DNA اسپرم و جایگزینی پروتامین به جای هیستون نداشت. در گروه بیسفنول A + عصاره چای سبز، عصاره چای سبز توانست به طور قابل توجهی اثرات مضر بیسفنول A بر تعداد، تحرک و قابلیت حیات اسپرم را جبران نماید. برخی مطالعات صورت گرفته در گذشته نیز یافته‌های ما را تائید می‌کنند [۲۱–۱۸، ۱۳].

تیمار حیوانات با بیسفنول A به مدت ۵۶ روز انجام شد تا اثرات این آلاینده زیست محیطی در یک دوره کامل اسپرماتوژنز که در رت حدود ۵۲ روز طول می‌کشد [۹]، مورد ارزیابی قرار گیرد.

قابلیت تحرک و قابلیت حیات اسپرم به عنوان مهم‌ترین پارامترهای اسپرم برای سنجش توانایی لقاح و همچنین تمامیت غشا اسپرم محسوب می‌شوند. غشاهای اسپرم پستانداران حاوی مقادیر زیادی اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشند که نسبت به پراکسیداسیون لیپیدی حاصل از استرس اکسیداتیو که موجب از دست رفتن سریع ATPداخل سلولی و بنابراین کاهش حرکات و قابلیت حیات اسپرم می‌شود، حساس می‌باشد [۱۴]. تغییرات ایجاد شده در طرح حرکتی و همچنین کاهش قابلیت حیات اسپرم ها در رت‌های تحت تأثیر بیسفنول A ناشی از قابلیت این آلاینده زیست محیطی در القا استرس اکسیداتیو بوسیله پراکسیداسیون لیپیدی غشاهای اسپرم می باشد [۱۷–۱۵].

برای حمایت از این ایده، در پژوهش حاضر نشان داده شد که عصاره چای سبز به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی [۱۸]، در گروه چای سبز + بیسفنول A، به طور معنی‌داری از اثرات مخرب بیسفنول A بر روی طرح‌های حرکت و همچنین قابلیت حیات اسپرم ممانعت نمود.

در این پژوهش نتایج بررسی‌های انجام شده نشان داد که تیمار رت‌ها با بیسفنول A کاهش معنی‌داری در تعداد اسپرم بوجود آورد. اما اینکه بیسفنول A چطور و با چه مکانیسمی موجب این عمل شده است مورد بحث می‌باشد. احتمالات زیر می‌توانند دلیل بر کاهش تعداد اسپرم در رت های تیمار شده با بیسفنول A در این پژوهش باشند. یک احتمال این است که بیسفنول A با قابلیت ایجاد استرس اکسیداتیو بر روی اسپرم‌های اپیدیدیمی و یا بر روی سلول های سرتولی و ژرمینال در بیضه و کاهش سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی بیضه و اسپرم، موجب کاهش تعداد اسپرم‌ها شده باشد.

بیسفنول A یک مخرب سیستم اندوکرینی است که در تکامل بیضه وقفه ایجاد می‌کند و باروری را در جنس نر کاهش می‌دهد [۱۳]. تحقیقات نشان داده است که بیسفنول A باعث تغییر در غلظت هورمون‌های جنسی می‌شود. از جمله این هورمون‌ها تستوسترون، استروژن و هورمون‌های گنادوتروپین (Follicle stimulating hormone-FSH) و (Lutein hormone-LH) می‌باشد. از طرف دیگر هورمون‌های نامبرده شده در فرآیند اسپرماتوژنز نقش عمده ای داشته و کیفیت اسپرم نیز وابسته به غلظت مناسب این هورمون‌ها است [۱۹]. بنابراین تغییرات هورمون‌های دخیل در اسپرماتوژنز توسط بیسفنول A نیز می‌تواند احتمال دیگری برای کاهش تعداد اسپرم‌ها در این پژوهش باشد.

در این مطالعه ما همچنین نشان دادیم که در گروه چای سبز + بیسفنول A، عصاره چای سبز توانست اثرات زیان آور بیسفنول A که موجب کاهش تعداد اسپرم‌های اپیدیدیمی شده بود را به طور معنی‌داری جبران نماید. عصاره چای سبز به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی مطرح می‌باشد و قادر است آسیب‌های ایجاد شده بوسیله رادیکال های آزاد را در غشا سلول‌ها مهار نماید [۲۰].

در بررسی مورفولوژی اسپرم‌ها، درصد مورفولوژی طبیعی اسپرم در گروه تیمار شده با بیسفنول A کاهش یافته بود (که موید افزایش درصد ناهنجاری‌های اسپرم است)، اما این کاهش نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود.

رنگ‌آمیزی آکریدین اورنژ و آنیلین بلو روش‌هایی هستند که به ترتیب برای تعیین تمامیت DNA (DNA دو رشته‌ای در مقابل تک رشته‌ای) [۱۲] و جایگزین شدن پروتامین به جای هیستون [۱۳]، به کار می‌رود. اگرچه ناهمگون بودن رنگ‌آمیزی گسترش‌ها، طولانی بودن زمان تثبیت (در مورد رنگ‌آمیزی آکریدین اورنژ) و خطای مشاهده‌گر در مطالعه میکروسکوپی ممکن است از محدودیت‌های این سنجش محسوب شود، اما این روش‌های ساده و ارزان هنوز به عنوان روش‌های مفید برای ارزیابی ساختمان کروماتین در طیف وسیعی از مطالعات پایه و کلینیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۲، ۲۱]. رنگ‌آمیزی آکریدین اورنژ و آنیلین بلو نشان داد که بیسفنول A در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی داری بر دناتوره شدن ساختمان دو رشته‌ای DNA(تمامیت DNA) و جایگزین شدن پروتامین به جای هیستون (که در طی بلوغ اسپرم اتفاق می‌افتد) ایجاد نکرد. تاکنون در هیچ مطالعه‌ای تأثیر بیسفنول A بر روی تمامیت DNA و همچنین جایگزینی پروتامین به جای هیستون گزارش نشده است.

از مقایسه‌ی میانگین وزن رت‌ها و وزن بیضه در پایان دوره تیمار اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد که نشان می‌دهد دوز ۲۰µg/kg/day، بیسفنول A به مدت ۵۶ روز تأثیر قابل توجهی در تغییر وزن بدن رت‌های بالغ و وزن بیضه آنها

ندارد. مطالعات صورت گرفته در گذشته نیز یافته ما را تائید می‌کنند [۲۶-۲۳].

از مجموعه مطالعاتی که در این خصوص انجام گرفت می‌توان نتیجه گرفت که زمان تیمار و دوز بیسفنول A تجویز شده نقش اصلی را در وزن بیضه دارند [۲۷] و احتمالا عدم کاهش وزن بیضه در این مطالعه ناشی از کافی نبودن دوز مصرفی بیسفنول A و مدت زمان تیمار می‌باشد.

۵. نتیجه‌گیری

بیسفنول A به عنوان یک آلاینده زیست محیطی قادر است با القا استرس اکسیداتیو ناهنجاری‌هایی را در برخی از پارامترهای سلامت اسپرم از قبیل تعداد، قابلیت حیات و قابلیت تحرک اسپرم به وجود آورد و عصاره چای سبز به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی قادر به کاهش اثرات مخرب این آلاینده بر این پارامترها است. بنابراین استفاده از این عصاره گیاهی واجد آنتی‌اکسیدانت‌های 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 القا کننده استرس اکسیداتیو هستند، به شمار آید.

مشارکت نویسندگان

خلق ایده، طراحی و اجرا و تهیه پیش‌نویس مقاله برعهده نویسنده مسئول بوده و سایر تویسندگان در تجزیه و تحلیل داده‌ها و ویرایش علمی این مقاله مشارکت نموده‌اند.

تضاد منافع

هیچ گونه تضاد منافعی وجود ندارد.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله محققان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اراک و حمایت مالی آن معاونت در انجام این پروژه تحقیقاتی تشکر و سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

1. Lyons G. Bisphenol A a Known Endocrine Disruptor. 1st ed. A WWF European Toxics Programme Report. 2000, pp: 21-25.

2. Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V and Olea N. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect* 1995; 103 (6): 608-612.

3. Sullivan JB and Krieger GR. Clinical Environmental Health and Toxic Exposures. 2nd ed. Philadelphia. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins. 2001, pp: 362-372.

4. Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A and et al. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 1996; 104 (3): 298-305.

5. Bolton NJ, Tapanainen J, Koivisto M and Vihko R. Circulating sex hormone-binding globulin and testosterone in newborns and infants. *Clin. Endocrinol.* 1989; 31 (2): 201-207.

6. Pastore RL and Fratellone P. Potential Health Benefits of Green Tea (*Camellia*

sinensis): A Narrative Review. *Explore.* 2006; 2 (6): 531-537.

7. Gupta J, Siddique YH, Beg T, Ara G and Afzal M. Protective role of green tea extract against genotoxic damage induced by anabolic steroid in cultured human lymphocytes. *Biol. Med.* 2009; 1 (2): 87-99.

8. Frei, B. and J. V. Higdon. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: Evidence fromanimal studies. *J. Nutr.* 2003; 133: 3275S-3284S.

9. Freitas F, Cordeiro-Mori F, Sasso-Cerri E, Lucas S and Miraglia S. Alterations of spermatogenesis in etoposide-treated rats: a stereological study. *Interciencia.* 2002; 27: 227-235.

10. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. World Health Organization. 2010, 32: 61-97.

11. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A and Marik JJ. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril.* 1984; 42: 87-91.

12. Wong A, Chuan SS, Patton WC and Jacobson JD. Addition of eosin to the aniline blue assay to enhance detection of immature sperm histones. *Fertil. Steril.* 2008; 90: 1999-2002.

13. Herath CB, Jin W, Watanabe G, Arai K, Suzuki AK and Taya K. Adverse effects of environmental toxicants, octylphenol and bisphenol A, on male reproductive functions in pubertal rats. *Endocrine*. 2004; 25: 163-172.

14. Bansal A and Bilaspuri G. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen Functions. *Vet. Med. Int.* 2011; 1-7. DOI: 10, 4061/2011/686137.

15. Aikawa H, Koyama S, Matsuda M, Nakahashi K, Akazome Y and Mori T. Relief effect of vitamin A on the decreased motility of sperm and the increased incidence of malformed sperm in mice exposed neonatally to bisphenol A. *Cell Tissue Res*. 2004; 315 (1): 119-24.

16. Sakaue M, Ohsako S, Ishimura R, Kurosawa S, Kurohmaru M, Hayashi Y, Aoki Y, Yonemoto J and Tohyama C. Bisphenol-A affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. *J. Occup. Health.* 2001; 43: 185-190.

17. Pengpeng J, Xiaoli W, Fei C, Yinyang B, Yingchun L, Rong Z, and Ling C. Low dose bisphenol A impairs spermatogenesis by suppressing reproductive hormone production and promoting germ cell apoptosis in adult rats. *J. Biomed. Res.* 2013; 27 (2): 135–144.

18. Ogura RA., Ikeda N, Yuki K, Morita O, Saigo K, Blackstock C, Nishiyama N and Kasamatsu T. Genotoxicity studies on green tea catechin. *Food Chem. Toxicol*. 2008; 46: 2190-2200.

19. Evans NP, North T, Dye S and Sweeney T. Differential effects of the endocrine-disrupting compounds bisphenol-A and octylphenol on gonadotropin secretion, in prepubertal ewe lambs. *Domest. Anim. Endocrinol*. 2004; 26 (1): 61-73.

20. Sato K, Sueoka K, Tanigaki R, Tajima H, Nakabayashi A, Yoshimura Y and Hosoi Y. Green tea extracts attenuate doxorubicin-induced spermatogenic disorders in conjunction

with higher telomerase activity in mice. *J. Assist. Reprod. Genet*. 2010; 27: 501–508.

21. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z and et al. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil. Steril.* 2003; 79 (3): 1616-1624.

22. Kazerooni T, Asadi N, Jadid L, Kazerooni M, et al. Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. *J. Assist. Reprod. Genet*. 2009; 26: 591-596.

23. Takao T, Nanamiya W, Nagano I, Asaba K, Kawabata K and Hashimoto K. Exposure with the environmental estrogen bisphenol A disrupts the male reproductive tract in young mice. *Life Sci.* 1999; 65 (22): 2351-2357.

24. Liu C, Duan W, Li R, Xu S, Zhang L, Chen C, He M, Y Lu, Wu H, Pi H, Luo X, Zhang Y, Zhong M, Yu Z and Z Zhou. Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity. *Cell Death Dis.* 2013; 4 (6): 1-9.

25. Ashby J, Tinwell H, Lefevre PA, Joiner R and Haseman J. The effect on sperm production in adult Sprague-Dawley rats exposed by gavage to bisphenol A between postnatal days 91-97. *Toxicol. Sci*. 2003; 74 (1): 129-38.

26. Takahashi O and Oishi S. Testicular toxicity of dietary 2, 2-bis (4-hydroxyphenyl) propane (bisphenol A) in F344 rats. *Arch. Toxicol.* 2001; 75 (1): 42-51.

27. Waechter JM, Dimond SS, Breslin WJ, Butala JH, Cagen SZ, Jekat FW and et al. Evaluation of reproductive organ development in CE-1 mice after prenatal exposure to bisphenol A. *Toxicologist.* 1999; 48 (1-S): 45-50.

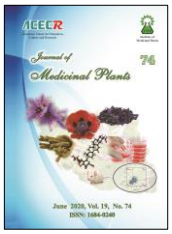
How to cite this article: Shariatzadeh SMA, Soleimani Mehranjani M, Taghipoor S, Azimi SA. Effect of green tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) extract on sperm health parameters in adult rats treated with Bisphenol A. ***Journal of Medicinal Plants*** 2020; 19(74): 63-72.
doi: 10.29252/jmp.19.74.63.

J. Med. Plants 2020; 19(74): 63-72

Institute of Medicinal Plants

Journal of Medicinal Plants

Journal homepage: www.jmp.ir



Research Article

Effect of green tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) extract on sperm health parameters in adult rats treated with Bisphenol A

Seyed Mohammadali Shariatzadeh, Malek Soleimani Mehranjani, Samane Taghipour*, Atena Sadat Azimi

Department of Biolog, Arak University, Arak, Iran

ARTICLE INFO

Keywords:
Bisphenol A
Green tea extract
Sperm health parameters

ABSTRACT

Background: Bisphenol A (BPA) disturbs male reproductive system performance via the production of free radicals. Green tea extract (GTE) is known as a potent antioxidant. **Objective:** The aim of this study was to investigate the effect of co-treatment of BPA and GTE as an antioxidant on male reproductive system performance. **Methods:** Adult male rats were divided into 4 groups: control, Bisphenol A (20 µg/kg/day), GTE (100 mg/kg/day) and Bisphenol A + GTE, treated for 8 weeks. The body weight and left testis weight were recorded. Left caudal epididymis was separated and kept in Ham's F10. Released sperms were used for analyzing the number, motility, viability and abnormalities of the sperm. The quality of sperm chromatin was assessed by nuclear staining acridine orange and aniline blue. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's test. The means were considered significant at $P < 0.05$. **Results:** A significant reduction in the number, motility and viability of sperm were seen in BPA group compared to the control group ($P<0.001$). BPA didn't have any effect on sperm DNA integrity and histon-protamine replacement ($P>0.05$). Also a considerable increase in sperm viability and motility was seen in the GTE group compared to the control. **Conclusion:** The results of this investigation showed that GTE could compensate the adverse effects of BPA on sperm parameters in adult rats.

Abbreviations: BPA, Bisphenol A; GTE, Green tea extract

* Corresponding author: Samanetaghipor@yahoo.com

doi: 10.29252/jmp.19.74.63.
Received 7 August 2017; Received in revised form 13 August 2017; Accepted 20 November 2018

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)