

## مطالعه استریولوژیکی اثر حفاظتی روغن سیاهدانه (*Nigella Sativa*) بر بافت بیضه موش به دنبال سمیت القاشده توسط پارانوایل فنل

ملک سلیمانی مهرنجانی<sup>\*</sup>, سیدمحمدعلی شریعتزاده<sup>۲</sup>, آرزو صولتی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۵/۰۳/۲۸ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۴/۱۸

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** پارانوایل فنل (p-NP) یک ترکیب استریولوژیک است که اثرات سمی بر روی اندام‌های مختلف از جمله بیضه ایجاد می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات سمی پارانوایل فنل بر روی بافت بیضه موش نیز ارزیابی اثر روغن سیاهدانه (*Nigella Sativa*) در مقابل این سمیت بود.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه ۲۴ سر موش نر بالغ نزد NMRI (n=۶) کنترل، روغن سیاهدانه (۵ml/kg/day)، پارانوایل فنل (۲۵۰mg/kg/day) و پارانوایل فنل به علاوه روغن سیاهدانه تقسیم و به مدت ۳۴ روز به صورت دهانی تیمار شدند. درنهایت، موش‌ها تشریح، بیضه راست آن‌ها خارج، فیکس، برش‌گیری و پردازش بافتی شد و با استفاده از روش هایدن‌هان آزان رنگ آمیزی شد. مقاطع بافتی بیضه از طریق روش استریولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت. شاخص پراکسیداسیون لیپیدی یعنی سطح مالون‌دی‌آلدید (MDA) سرم موش‌ها نیز اندازه‌گیری شد. داده‌ها با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح  $P < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** کاهش معنی‌داری در قطر ( $P < 0.08$ ), ارتفاع اپی‌تیلیوم زایشی ( $P < 0.07$ ) و ضخامت غشا پایه لوله‌های منی‌ساز ( $P < 0.05$ ) و نیز تعداد کل سلول‌های اسپرماتوگونی، سرتولی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید دراز و گرد ( $P < 0.01$ ) مشاهده گردید و همچنین افزایش معنی‌داری در سطح MDA (۱) در گروه p-NP در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. پارامترهای فوق در گروه پارانوایل فنل به علاوه روغن سیاهدانه نسبت به گروه پارانوایل فنل به‌طور معنی‌داری و در سطح گروه کنترل جبران شد ( $P < 0.05$ ).

**بحث و نتیجه‌گیری:** روغن سیاهدانه اثر حفاظتی بر روی سمیت ناشی از پارانوایل فنل در بافت بیضه موش‌ها دارد. بنابراین، می‌توان روغن سیاهدانه را به عنوان یک مکمل درمانی در جلوگیری از اثرات نامطلوب مواجهه با پارانوایل فنل در مناطق صنعتی، پیشنهاد کرد.

**کلیدواژه‌ها:** استریولوژیکی، بیضه، پارانوایل فنل، روغن سیاهدانه، موش

مجله پزشکی ارومیه، دوره پیست و هفتم، شماره ششم، ص ۵۱۴-۵۰۳، ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: اراک، دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، تلفن و نمایر ۰۸۶-۴۱۷۳۴۰۹

Email: m-soleimani@araku.ac.ir

### مقدمه

درنهایت باعث اختلال در عملکرد سیستم تولیدمیثی حیوانات شوند. در میان گزنواسترورژن‌ها، آلکیل فنل‌ها توانایی اتصال به گیرنده‌های استریولوژنی را دارند و دارای فعالیت استریولوژنیک ضعیف در شرایط *in vivo* و *in vitro* و نیز اثرات کارسینوژنیک و سمی هستند. آلکیل فنل‌ها در غلظت‌های قابل توجهی در محیط‌زیست یافت می‌شوند. وجود آلکیل فنل‌ها و یا متabolیت‌های آن‌ها در ادرار، سرم، مایع آمنیوتیک، شیر و حتی مایع منی گزارش شده است (۲). از

مواد شیمیایی فراوانی در محیط وجود دارد که شبه هورمون بوده و حاصل فعالیت‌های بشر در طبیعت هستند. این مواد که توانایی تداخل با سیستم اندوکرینی جانداران را دارند، مواد مخل سیستم اندوکرینی (EDCs) نامیده می‌شوند و روی سیستم تولیدمیثی تاثیرگذارند (۱). اکثر EDC‌ها به عنوان گزنواسترورژن عمل می‌کنند، به این معنی که می‌توانند عملکرد اندروژن‌های استریولوژنی را تقلید کنند، با آن مقابله کنند یا آن را تغییر دهند و

<sup>۱</sup> دانشیار زیست تکوینی، دانشگاه اراک، اراک، ایران (نويسته مسئول)

<sup>۲</sup> استاد بافت شناسی و جنین شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

<sup>۳</sup> کارشناسی ارشد زیست تکوینی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

سیاهدانه به دنبال تیمار با پارانوتانیل فنل بر روی بافت بیضه موش بالغ انجام شد.

### مواد و روش کار

در این مطالعه تجربی، ۲۴ سر موش نر بالغ نژاد NMRI با وزن تقریبی  $۳۲\pm۳$  گرم از انتستیتوپاستور ایران خردباری و در خانه حیوانات دانشگاه اراک تحت شرایط استاندارد (دمای  $۲۱\pm۲$  درجه سانتی گراد و نور محیطی با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. موش‌ها به منظور سازگاری با محیط و از بین رفتن استرس احتمالی ایجاد شده در اثر تغییر مکان، به مدت ۲ هفته نگهداری شدند؛ و سپس به صورت تصادفی به ۴ گروه<sup>۶</sup> تابی به ترتیب زیر تقسیم شد: گروه اول: کنترل که شامل موش‌های سالمی بودند که به جز آب و غذا ماده‌ی دیگری را دریافت نکردند.

گروه دوم: این گروه روغن سیاهدانه را به میزان ۵ml/kg/day دریافت کردند (۱۲).

گروه سوم: دوز ۲۵۰mg/kg/day از پارانوتانیل فنل را دریافت کردند (۱۳).

گروه چهارم: این گروه روغن سیاهدانه ۵ml/kg/day و پارانوتانیل فنل ۲۵۰mg/kg/day را دریافت کردند.

تیمار به صورت دهانی و به مدت ۳۴ روز برای تمامی گروه‌ها انجام شد (۱۴). حیوانات پس از پایان دوره تیمار به وسیله دی‌اکسی‌لر دی‌اکسید کربن اتر بی‌هوش و بعد از تشریح، بیضه راست آن‌ها خارج و توزین شد و حجم (immersion) آن با استفاده از روش غوطه‌ورسازی تعیین گردید؛ سپس بیضه‌ها به منظور ثبوت بافتی در فیکساتیور MDF<sup>۱</sup> به مدت یک هفته قرار گرفت.

در این مطالعه از روش Orientator به منظور ایجاد برش‌های IUR<sup>۲</sup> استفاده گردید (۱۵). این برش‌ها به عنوان یک اصل مورفو‌لولوژیکی در مطالعات استریولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگر نمونه موردنظر درجه محسوسی از آنیزوتروپی داشته باشد و دارای ساختار هتروژن باشد، روش‌های ویژه‌ای برای به دست آوردن برش‌های IUR موردنیاز است که این روش‌ها شامل Orientator و Isector می‌باشد. روش Orientator بیشتر در اندام‌های بزرگ مورداستفاده قرار می‌گیرد. در واقع این روش امکان اندازه‌گیری دانسیته طول، سطح و سایر پارامترهای استریولوژیکی را با ایجاد برش‌های IUR فراهم می‌کند (۱۶). برش‌های حاصل شده از هر بیضه با دستگاه پاساز مورد پاساز بافتی قرار گرفت و در بلوك پارافینی بلوك‌گری شدند، سپس از قالب‌های پارافینی آماده توسط میکروتوم (Leitz 1512) برش‌های ۵ و ۲۰ میکرون تهیه و با روش

آلکیل فنل‌ها، ترکیباتی با زنجیره کوتاه به نام نوتانیل فنل مشتق می‌شود.

نوتابنیل فنل در صنعت به منظور تولید روغن‌ها، رزین‌ها، مواد شوینده، رنگ‌ها، وسایل آرایشی، آفت‌کش‌ها و اجناس پلاستیکی به‌وقور مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳). خاصیت هیدروفوتبیسیته بالا و انحلال پذیری پایین نوتانیل فنل، سبب شده است تا این ماده در بسیاری از بخش‌های محیط‌زیست یافت شود (۴) و متعاقب آن، تجمع و ذخیره این ماده در بافت گونه‌های آبزی از جمله ماهی‌ها (۵) سبب گشته تا نوتانیل فنل از طریق زنجیره غذایی وارد اکوسیستم شود که برای سلامتی انسان و حیوانات خطر بزرگی به شمار می‌رود (۶). نوتانیل فنل از طریق افزایش ROS و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر سوپراکسید دی‌سیموتاژ، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز منجر به القای استرس اکسیداتیو در سیستم تولیدمثیل نر می‌شود. در حضور این آلاینده زیست‌محیطی بافت بیضه دچار اختلالات فراوانی می‌شود که از جمله می‌توان به کاهش اندازه بیضه و سطح تستوسترون، اختلال در ساختار بیضه و توقف اسپرماتوژن اشاره کرد (۷، ۸).

سیاهدانه با نام علمی *Nigella sativa* یک گیاه علفی یک‌ساله، دو لپه متعلق به زیرده جدائلبرگان و تیره آلله است (۸). دانه‌ها به عنوان بخش اصلی مورد استفاده و دارای ترکیبات مختلفی است که از جمله آن می‌توان به وجود قندنهای احیاکننده، موسیلاژها، فیبر خام، رزین، آکالالوبیدهایی نظیر نیجل آمین، استرول‌ها، تانین‌ها، فلاونوپیدهای، مواد معدنی و ویتامین‌ها شاره کرد (۹).

سیاهدانه به صورت سنتی برای اهداف پزشکی استفاده می‌شود که هم گیاه و هم عصاره روغنی آن برای حفظ سلامت سیستم تنفس و سلامت معده، روده، کلیه و عملکرد کبد کاربرد دارد (۱۰). روغن سیاهدانه حاوی ترکیباتی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که از جمله می‌توان به ترکیبات تیموکوئینون (TQ)، دی‌تیموکوئینون (DTQ)، تیموهیدروکینون (DHQ) و تیمول (THY) اشاره کرد که به میزان قابل توجهی از ایجاد تغییرات ناشی از اثر مواد شیمیایی سمی بر روی ارگان‌های احتشایی، ممانعت می‌کند که این اثر حفاظتی را می‌توان به نقش جاروبگری سیاهدانه در مقابل رادیکال‌های آزاد و مهار استرس اکسیداتیو نسبت داد (۹). همچنین سیاهدانه باعث افزایش اسپرماتوژن در مراحل اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه، تعداد سلول‌های اسپرماتوژا، ترشحات غدد ضمیمه و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی (LPO) و بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در سیستم تولیدمثیل می‌شود که همگی نشانگر اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی این ماده است (۸). لذا، این مطالعه به منظور بررسی اثر حفاظتی روغن

<sup>2</sup> Isotropic uniform random ampling

<sup>۱</sup> Modified Davidson's fluid fixative

$$VV_{\text{intersitial}} = \sum_{i=1}^n P_i / \sum_{i=1}^n P_t$$

$$V_{\text{intersitial}} = V_{\text{testis}} \times VV_{\text{intersitial}}$$

برای محاسبه ارتفاع اپیتیلیوم زایشی از فرمول  $H = Sv/Vv$  استفاده شد. برای به دست آوردن دانسیته حجمی اپیتیلیوم زایشی مجموع نقاط برخورد کرده پرروب با تصویر بافت بیضه مربوط با هر میدان دید شمارش و سپس تعداد کل نقاط برخورد کرده با اپیتیلیوم زایشی نیز شمارش و بر مجموع نقاط برخورد کرده با بافت بیضه تقسیم شد به همین ترتیب دانسیته حجمی اپیتیلیوم زایشی و سپس دانسیته سطحی اپیتیلیوم زایشی از طریق فرمول  $Sv = \frac{\sum_{i=1}^n Iit}{I/P} \times \sum_{i=1}^n Pt$  محدوده ای  $I/P = 16$  و  $Pt = 15$  که در آن  $Sv = \sum_{i=1}^n Ii$  تعداد برخوردها با سطح داخلی اپیتیلیوم زایشی،  $\sum_{i=1}^n Pi$  = تعداد نقاط برخورد کرده با اپیتیلیوم زایشی و  $L/p = L$  طول خط گردید سطح در مقیاس واقعی بافت ( $\mu m$ ) (۲۱۴) می‌باشد.

برای اندازه‌گیری قطر لوله‌های منی‌ساز نیز از میدان‌های دیدی که با روش نمونه‌گیری تصادفی منظم و با بزرگنمایی ۱۰ انتخاب شد، عکس‌برداری صورت گرفت؛ سپس با استفاده از فریم مخصوص شمارش و نرمافزار متوبیک (Motic image 2000) قطر عمود بر محور طولی حدود ۱۳۰-۱۵۰ لوله منی‌ساز اندازه‌گیری شد (۲۰). برای محاسبه طول لوله‌های منی‌ساز، از عکس‌های مربوط به قطر لوله‌های منی‌ساز و فریم مخصوص شمارش طول، استفاده شد و سرانجام دانسیته طولی لوله‌های منی‌ساز با استفاده از فرمول  $Lv = \frac{\sum_{i=1}^n Qi}{a/f \sum_{i=1}^n Pi}$  محاسبه گردید که در آن  $Qi = \sum_{i=1}^n Q_i$  مجموع تبویلهای انتخاب شده،  $a/f$  = سطح فریم موردنظر در مقیاس بافت و  $Pi$  = مجموع نقاط برخورد کننده با بافت بیضه می‌باشد. سپس با ضرب دانسیته طولی در حجم نهایی بیضه طول کل لوله‌های منی‌ساز به دست آمد (۱۵، ۱۶). ووبا استفاده از روش هارمونیک میانگین ضخامت غشا پایه محاسبه گردید (۲۱). بدین منظور، ۲۴-۲۶ میدان دید از اسلایدهای ۵ میکرونی بافت بیضه هر موش با استفاده از ابزکتیو با بزرگنمایی ۱۰۰ و روش تصادفی منظم انتخاب شد و پرروب حاوی خطوط موازی و مساوی به صورت تصادفی بر روی بافت بیضه قرار گرفت. سپس از محلی که خطوط پرروب با سطح داخلی غشا پایه برخورد کرده بود خطی عمود بر خط مماس غشا خارجی رسم و طول این خط توسط نرمافزار متوبیک اندازه‌گیری شد. به طور متوسط ۱۵۰-۱۳۰ برخورد اندازه‌گیری و میانگین ضخامت غشا پایه با استفاده از فرمول هارمونیک تخمین زده شد.

Harmonic mean Thickness layer =  $8/3\pi \times (\text{number of measurements})/(\text{sum of the reciprocal of orthogonal intercept lenght})$ .

Heidenhain's Azan چروکیدگی با استفاده از تروکار به صورت تصادفی سه قطعه گرد از مقاطع بافتی IUR بیضه هر موش تهیه و در هر یک، دو قطر عمود برهم اندازه‌گیری و سپس میانگین شاع آن‌ها محاسبه و به عنوان before r معرفی گردید. چروکیدگی ایجادشده ناشی از فرآیندهای فیکساسیون، آب‌گیری و پارافینه کردن بافت و تراکم و فشردگی ایجادشده از عملکرد تیغ موجود در میکروتوم است. بهمنظور تعیین مقدار دقیق ساختارهای مورفو‌لوزیکی در سطح بافت یا سلول از نظر ریاضی، می‌توان نتایج را با ضرب در عدددهای حاصل از اندازه‌گیری چروکیدگی و تراکم (فسردگی) که قبلاً به دست آمده، بسط داد که تعداد غیرواقعی از تعداد دقیق سلول‌ها حاصل می‌شود که فراتر از محدوده استریولوزی می‌باشد. اگرچه اکثر مطالعات سعی بر مقایسه مقادیر در بین گروه‌ها دارند و مواد نیز به طور مشابه در همه گروه‌ها آمده می‌شوند بنابراین، اگر چروکیدگی و تراکم در همه گروه‌ها مشابه باشد تصحیح آن (محاسبه چروکیدگی) ممکن است دیگر ضروری نباشد. بهمنظور محاسبه چروکیدگی همان‌طور که قبلاً توضیح داده شد با تروکار به طور میانگین دو یا سه قطعه گرد از برش‌های IUR تهیه و دو قطر عمود بر هم از هر کدام اندازه‌گیری و مساحت سطح دایره محاسبه گردید. بعد از رنگ‌آمیزی، مساحت قطعات گرد مجدداً اندازه‌گیری و چروکیدگی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۵، ۱۷).

$$Volume shrinkage = 1 - (AA/AB)^{1.5}$$

و AB به ترتیب مساحت قطعات گرد بعد و قبل از پردازش، برش‌گیری و رنگ‌آمیزی در نظر گرفته شد. سپس فیکساسیون، پاساز بافتی، برش‌گیری و رنگ‌آمیزی مجدداً دو قطر عمود بر هم در سه قطعه مذکور، اندازه‌گیری و میانگین شاع آن‌ها به عنوان r after در نظر گرفته شد و مقدار چروکیدگی هر بیضه با استفاده از فرمول مربوطه محاسبه گردید. با کم کردن میزان چروکیدگی از حجم حاصل از روش غوطه‌ورسازی، حجم واقعی بیضه محاسبه گردید (۱۸، ۱۵).

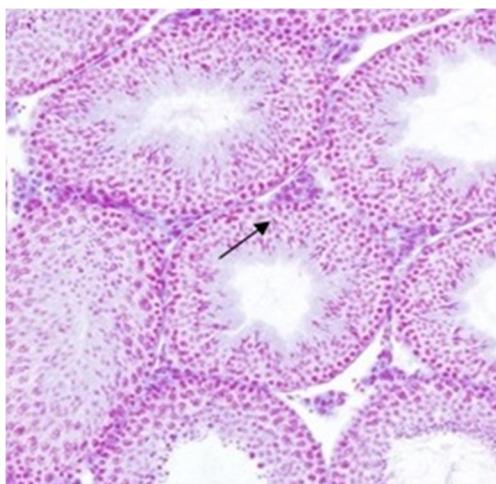
بهمنظور محاسبه حجم لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی با استفاده از میکروسکوپ مدل OLYMPUS DP12 مجهز به دوربین و روش نمونه‌گیری تصادفی منظم به طور میانگین ۵ میدان دید از هر برش ۵ میکرونی با قرار دادن پرروب نقطه‌ای به صورت تصادفی روی هر فیلد موربدرسی قرار گرفت. کل نقاط برخورد کرده از پرروب با کل میدان دید انتخاب شده و به همین ترتیب نقاط برخورد کرده با لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی شمارش شد و دانسیته حجمی هر یک محاسبه شد و سپس حجم کل مربوط به هر یک از اجزا به طور غیرمستقیم و با ضرب کردن دانسیته حجمی در حجم کل بیضه هر موش تخمین زده شد (۱۹، ۱۵).

با استفاده از آب سرد خنک و سانتریفیوژ شدن. مایع رویی به دقت جدا و جذب آن در ۵۳۲ نانومتر در مقابل blank که حاوی تمام ترکیبات به استثنای نمونه بود، خوانده شد. غلظت مالون دی آلدید با استفاده از ضریب خاموشی آن که  $M-1Cm-1 \times 10^5 = 1/56$ ، محاسبه گردید و بر حسب میکرومولار بیان شد.

داده‌های بدست آمده توسط نرم‌افزار 16 Spss و روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون آماری توکی، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح  $P < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

#### تغییرات هیستوپاتولوژیک بیضه:

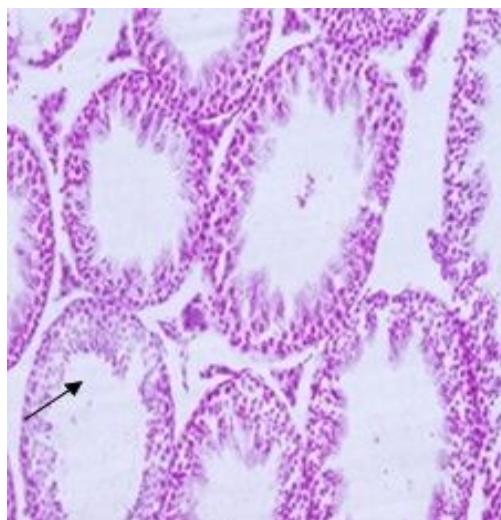
به دنبال مطالعات بافت‌شناسی در بافت بیضه گروه‌های مختلف آزمایشی، مشاهده شد که در گروه کنترل اپی‌تیلیوم زایشی لوله‌های منی‌ساز دارای آرایش منظم بوده و نظم و به هم پیوستگی سلول‌های جنسی کاملاً حفظ شده بود (شکل ۱). پارانوتایل فتل تغییرات مورفو‌لولوژیک شدیدی را در بافت بیضه اعمال می‌کند. در آن دسته از موش‌هایی که فقط پارانوتایل فتل را دریافت کرده بودند، لوله‌های منی‌ساز بافت بیضه آتروفی شدیدی را تؤمن با از هم گسیختگی و واکوئل دار شدن اپی‌تیلیوم زایا نشان داد. اتساع و پرخونی عروق خونی، تجمع مایعات ناشی از آدم بافتی و افزایش فضای بینابینی نیز در بافت همبند بینابینی و همچنین کاهش تراکم اسپرم در لوله‌های منی‌ساز جلب‌توجه می‌نمود (شکل ۲). در گروهی که پارانوتایل فتل و روغن سیاهدانه را با هم دریافت کرده بودند، اپی‌تیلیوم زایی لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی طبیعی بوده و هیچ نشانه‌ای از آدم در بافت بینابینی مشاهده نمی‌شد (شکل ۳). در گروه روغن سیاهدانه ساختار لوله‌های منی‌ساز مشابه گروه کنترل بود (شکل ۴).



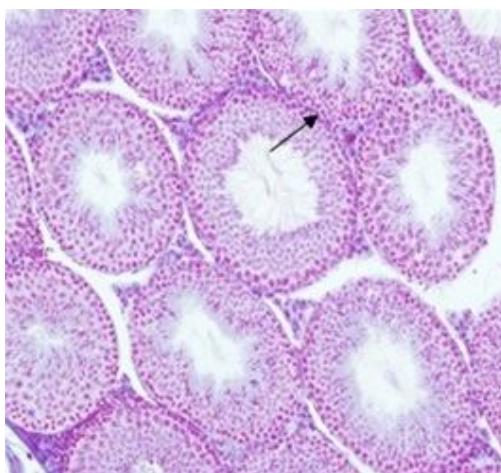
شکل (۱): آرایش طبیعی اپی‌تیلیوم زایشی در گروه کنترل (برش‌های ۵ میکرومتری، رنگ‌آمیزی هایدن‌هان آزان، بزرگنمایی ۲۰۰×)

برای محاسبه تعداد انواع سلول‌ها نیز از روش Optical Disector و فریم مخصوص شمارش استفاده شد (۱۵ و ۲۲). به همین منظور از ابیکتیو با بزرگنمایی ۱۰۰ و روش تصادفی منظم استفاده گردید و همه برش‌های ۲۰ میکرومتری بافت بیضه هر موش با ND 221 B، میکروکیتور (Heidenhain, Germany) مورد ارزیابی قرار گرفت. نحوه تشخیص سلول‌ها بدین صورت بود که هسته سلول‌های سرتولی بر روی غشا پایه قرار داشت و دارای هستک بزرگ قابل تشخیص بود. اسپرماتوگونی‌ها نیز روی غشا پایه تکیه داشتند و دارای هسته گرد تا بیضوی شکل بودند و سایز هسته آن‌ها بزرگ‌تر از سیتوپلاسمشان بود. اسپرماتوسیت‌های اولیه با اندازه بزرگ‌تر و نسبت به اسپرماتوگونی‌ها اغلب نزدیک‌تر به لومن قرار داشتند. اسپرماتیدهای جوان گرد کوچک‌تر از اسپرماتوسیت‌های اولیه و در مقایسه با آن‌ها به لومن نزدیک‌تر بودند این سلول‌ها دارای هسته گرد بزرگ و همچنین سیتوپلاسم وسیع بودند و اکرزوم صورتی رنگ در مراحل مختلف تکامل در آن‌ها دیده می‌شد و درنهایت اسپرماتیدهای دراز شده با هسته کاملاً کشیده و متراکم خود که بر روی آن اکرزوم کشیده شده بود و با فلازیل مخصوص خود که ناحیه لومن لوله را پر می‌کرد قابل تشخیص بود به طور متوسط تعداد ۱۳۰-۱۵۰ سلول در هر موش شمارش شد و سپس دانسته عددی انواع سلول‌ها با استفاده از فرمول  $Nv = \frac{\sum_{i=1}^n Qi}{a/f \sum_{i=1}^n Pi}$  محاسبه گردید که در آن  $\sum Qi =$  مجموع تعداد انواع سلول‌های شمرده شده،  $\sum Pi =$  مجموع نقاط برخورد کرده با فیلدهای انتخابی،  $a=f=h$  = ارتفاعی از برش که در آن شمارش صورت می‌گیرد و  $a/f =$  سطح فریم در مقیاس واقعی بافت می‌باشد. بعد از محاسبه فرمول مذکور، با ضرب عدد حاصل شده در حجم کل بیضه، تعداد کل انواع سلول‌های موردنظر به دست آمد.

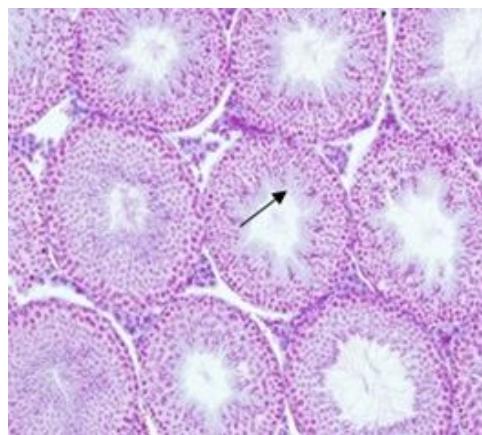
برای اندازه‌گیری سطح مالون دی آلدید (MDA) سرم، از روش Buege و Aust استفاده شد. در این روش MDA با تیوباربیتوریک اسید (Thiobarbituric acid=TBA) واکنش داده و ترکیبی نارنجی رنگ تولید می‌کند که پرتوهایی با طول موج حدود ۵۳۲-۵۳۵ نانومتر را جذب می‌کند (۲۴، ۲۳). قبل از بیوپسی بافت، خون گیری از قلب حیوانات صورت گرفت. سپس با سانتریفیوژ نمودن نمونه‌های خونی به مدت ۱۵ دقیقه و با دور ۳۰۰۰ در دقیقه، پلاسمما از سرم جدا و نمونه‌های سرم در دمای  $-80^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد تا زمان سنجش میزان مالون دی آلدید نگهداری شد. برای اندازه‌گیری MDA، ابتدا محلول TCA-TBA-HCL (شامل تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱۵ w/v، تیوباربیتوریک اسید (TBA) ۰/۳۷۵ w/v) و اسید کلریدریک (۰/۲۵ نرمال) تهییه و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری جوش قرار داده شد، سپس نمونه‌ها



شکل (۲): کاهش ارتفاع اپیتیلیوم زایشی، تخریب اسپرماتوژن، بی نظمی و واکوئل زایی و گسیختگی اپیتیلیوم زایشی و افزایش در فضای بین توبولی در گروه تیمار شده با پاراونایل فنل (برش های ۵ میکرومتری، رنگ آمیزی هایدن هان آزان، بزرگنمایی  $\times 200$ ).



شکل (۳): آرایش تقریباً طبیعی اپیتیلیوم زایشی و روند طبیعی اپیتیلیوم زایشی در گروه تیمار شده با پاراونایل فنل و روغن سیاه دانه (برش های ۵ میکرومتری، رنگ آمیزی هایدن هان آزان، بزرگنمایی  $\times 200$ ).



شکل (۴): نمای لوله های منی ساز شبیه به گروه کنترل در گروه تیمار شده با روغن سیاه دانه (برش های ۵ میکرومتری، رنگ آمیزی هایدن هان آزان، بزرگنمایی  $\times 200$ ).

پارانوتایل فنل+روغن سیاهدانه توانسته افزایش قابل توجهی در میانگین قطر، ارتفاع اپیتلیوم زایشی و ضخامت غشاء پایه لوله‌های منی‌ساز در مقایسه با گروه پارانوتایل فنل ایجاد نماید و میزان این پارامترها را به سطح گروه کنترل برساند (جدول ۳).

بنابراین مشاهده شد که روغن سیاهدانه در گروه پارانوتایل فنل+روغن سیاهدانه توانسته افزایش قابل توجهی در میانگین قطر، ارتفاع اپیتلیوم زایشی و ضخامت غشاء پایه لوله‌های منی‌ساز در مقایسه با گروه پارانوتایل فنل ایجاد نماید و میزان این پارامترها را به سطح گروه کنترل برساند (جدول شماره ۳). مقایسه میانگین وزن بدن موش‌ها در ابتدا و انتهای آزمایش و نیز وزن بیضه در بین گروه‌های مختلف موش اختلاف آماری معنی‌داری را نشان نداد ( $P>0.05$ ). همچنین از مقایسه میانگین غلظت MDA در موش‌های تیمار شده با پارانوتایل فنل در مقایسه با گروه کنترل MDA افزایش معنی‌داری مشاهده شد ( $P<0.001$ ). از طرف دیگر در گروه پارانوتایل فنل + سیاهدانه در مقایسه با گروه پارانوتایل فنل کاهش معنی‌داری دارد ( $P<0.001$ ). به عبارت دیگر در گروه پارانوتایل فنل + سیاهدانه روغن سیاهدانه توانست اثرات مخرب پارانوتایل فنل در پراکسیداسیون لیپیدی را در مقایسه با گروه پارانوتایل فنل به صورت معنی‌داری جبران کند. روغن سیاهدانه به‌نهایی توانست باعث کاهش معنی‌دار غلظت MDA در مقایسه با گروه کنترل شود ( $P<0.001$ ).

**جدول (۱):** مقایسه میانگین تعداد انواع سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتید دراز، اسپرماتید گرد و سرتولی ( $\times 10^6$ ) در گروه‌های مختلف موش ۳۴ روز پس از تیمار با پارانوتایل فنل (۲۵۰ mg/kg/day) و روغن سیاهدانه (۵ ml/kg/day). مقادیر به صورت  $means \pm SD$  می‌باشد.

گروه‌ها	میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی $\times 10^6$	میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت $\times 10^6$	میانگین تعداد سلول اسپرماتید دراز $\times 10^6$	میانگین تعداد سلول اسپرماتید گرد $\times 10^6$	میانگین تعداد سلول‌های سرتولی $\times 10^6$
کنترل	۵/۹۱ $\pm$ /۲۱۱ <sup>a,c</sup>	۲۵/۳۵ $\pm$ /۹۶۵ <sup>a</sup>	۳۴/۸۹ $\pm$ ۲/۹۶ <sup>a</sup>	۳۷/۱۸ $\pm$ ۳/۰۴ <sup>a</sup>	۳/۵۴ $\pm$ /۰۲۵۴ <sup>a</sup>
پارانوتایل فنل	۴/۵۵ $\pm$ /۳۵۸ <sup>b</sup>	۱۸/۴۶ $\pm$ /۸۸۲ <sup>b</sup>	۲۱/۹۳ $\pm$ ۱/۴۳ <sup>b</sup>	۲۵/۲۹ $\pm$ ۲/۲۴ <sup>b</sup>	۲/۷۳ $\pm$ /۰۲۵۳ <sup>b</sup>
سیاهدانه+پارانوتایل فنل	۵/۷۵ $\pm$ /۰۲۶۱ <sup>a</sup>	۲۷/۸۲ $\pm$ ۲/۹۴ <sup>a,c</sup>	۳۶/۲۶ $\pm$ ۲/۶۵ <sup>a</sup>	۳۵/۶۴ $\pm$ ۵/۹۸ <sup>a</sup>	۳/۶۸ $\pm$ /۰۳۴۵ <sup>a</sup>
روغن سیاهدانه	۶/۳۶ $\pm$ /۰۲۸۷ <sup>c</sup>	۲۹/۵۸ $\pm$ ۱/۱۸ <sup>c</sup>	۳۲/۷۵ $\pm$ ۱/۵۵ <sup>a</sup>	۳۱/۸۴ $\pm$ ۱/۳۰ <sup>a</sup>	۳/۵۲ $\pm$ /۰۱۷۲ <sup>a</sup>

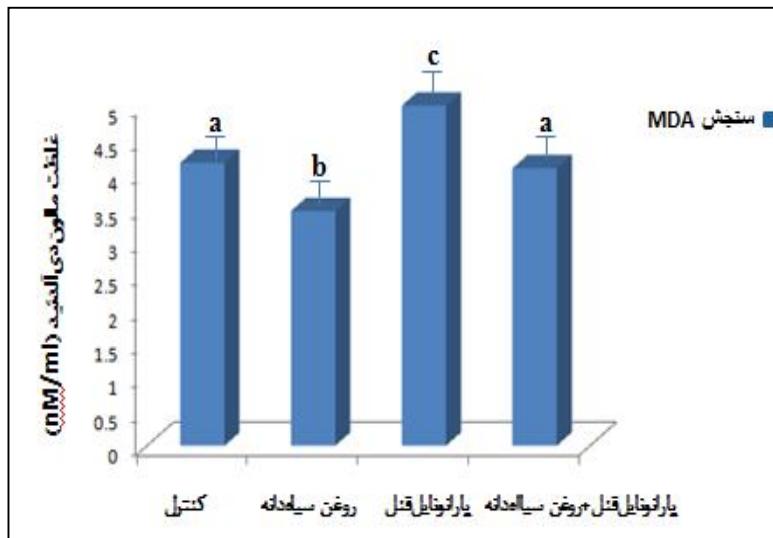
**جدول (۲):** مقایسه میانگین حجم کل بیضه (mm<sup>3</sup>), حجم لوله‌های منی‌ساز (mm<sup>3</sup>) و حجم بافت بینایینی (mm<sup>3</sup>) در گروه‌های مختلف موش ۳۴ روز پس از تیمار با پارانوتایل فنل (۲۵۰ mg/kg/day) و روغن سیاهدانه (۵ ml/kg/day). مقادیر به صورت  $means \pm SD$  می‌باشد.

گروه‌ها	وزن بیضه (گرم)	وزن بدن (گرم)	حجم کل بیضه (mm <sup>3</sup> )	حجم لوله‌های منی‌ساز (mm <sup>3</sup> )	حجم بافت بینایی (mm <sup>3</sup> )
کنترل	۳۶/۶۷ $\pm$ ۲/۶۱	۰/۱۲ $\pm$ ۰/۰۱	۷۹/۴۴ $\pm$ ۱۹/۰۱ <sup>a</sup>	۶۴/۳۵ $\pm$ ۱۶/۰۹ <sup>a</sup>	۱۵/۰۹ $\pm$ ۳/۲۹ <sup>ab</sup>
پارانوتایل فنل	۳۸/۶۷ $\pm$ ۳/۶۳	۰/۱۳ $\pm$ ۰/۰۱	۶۵/۶۰ $\pm$ ۹/۸۵ <sup>a</sup>	۴۶/۸۰ $\pm$ ۷/۴۴ <sup>a</sup>	۱۸/۹۷ $\pm$ ۲/۲ <sup>b</sup>
سیاهدانه+پارانوتایل فنل	۳۵/۷۲ $\pm$ ۴/۵۷	۰/۱۲ $\pm$ ۰/۰۱	۷۴/۶۵ $\pm$ ۹/۰۷ <sup>a</sup>	۶۰/۳۹ $\pm$ ۷/۶۷ <sup>a</sup>	۱۴/۲۶ $\pm$ ۱/۶۸ <sup>a</sup>
روغن سیاهدانه	۳۴/۲۷ $\pm$ ۳/۲۶	۱/۰ $\pm$ ۰/۰۱	۷۶/۱۳ $\pm$ ۱۲/۸۱ <sup>a</sup>	۶۲/۱۷ $\pm$ ۹/۹۹ <sup>a</sup>	۱۳/۹۶ $\pm$ ۲/۸ <sup>a</sup>

به دنبال اختلالات ایجاد شده در بافت بیضه در پی تیمار با پارانوتایل فنل، روند اسپرماتوزن و کمیت سلول‌های جنسی و سرتولی نیز تحت تأثیر قرار گرفت که در این مطالعه میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید دراز و گرد و سلول‌های سرتولی در گروه پارانوتایل فنل نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت ( $P<0.001$ )؛ و روغن سیاهدانه در گروه پارانوتایل فنل به علاوه روغن سیاهدانه توانت موجب افزایش معنی‌دار در میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سرتولی در مقایسه با گروه پارانوتایل فنل شود ( $P<0.001$ ) (جدول ۱).

از مقایسه میانگین حجم کل بیضه موش‌ها (mm<sup>3</sup>) در بین گروه‌های مختلف موش اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P>0.05$ ) میانگین حجم لوله‌های منی‌ساز (mm<sup>3</sup>) در گروه پارانوتایل فنل نسبت به گروه کنترل به میزان ۲۷ درصد کاهش نشان داد اما این کاهش معنی‌داری نبود ( $P>0.05$ ) در حالی که میانگین حجم بافت بینایینی در گروه پارانوتایل فنل تنها نسبت به گروه‌های پارانوتایل فنل+سیاهدانه و روغن سیاهدانه افزایش معنی‌داری نشان داد ( $P<0.02$ ) و نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نداشت ( $P>0.05$ ) (جدول ۲).

میانگین طول لوله‌های منی‌ساز در بین چهار گروه تفاوت بنابراین مشاهده می‌شود که روغن سیاهدانه در گروه



نمودار (۱): مقایسه میانگین MDA در گروههای مختلف، ۳۴ روز پس از تیمار با پارا-تیامول فنل (۲۵۰ میلی گرم/کیلوگرم/روز) و روغن سیاه‌دانه (۵ میلی لیتر/کیلوگرم/روز). مقادیر به صورت  $\text{mean} \pm \text{SD}$  می‌باشد. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشد (one way ANOVA and Tukey's test,  $P < 0.05$ ).

نتایج مطالعه کاهش معنی‌داری را در قطر، ارتفاع و ضخامت غشای پایه لوله‌های منی‌ساز نشان داد؛ که با نتایج مطالعه Soleimani و همکاران همسو می‌باشد که طی مطالعه خود کاهش قطر، ضخامت غشای پایه و ارتفاع اپیتلیوم زایشی را در رت‌هایی که با دوز ۲۵۰ mg/kg/day از p-NP و به مدت ۹۰ روز (از دوران جنینی تا بلوغ) تیمار شده بودند، گزارش کردند (۱۵). عموماً قطر لوله‌های منی‌ساز فاکتوری است که بیانگر فعالیت اسپرما-توژنیک بیشه می‌باشد (۲۸) و کاهش تعداد سلول‌های سرتولی و تخریب اسپرما-توژنر احتمالاً کاهش قطر لوله‌های منی‌ساز را سبب می‌گردد (۲۹).

کاهش کانکسین ۴۳ و اختلال در ارتباطات بین سلولی موسوم به اتصالات شکاف دار، در پی تیمار با NP (۳۰) اختلالاتی را در غشای سلول‌های جنسی و سرتولی ایجاد می‌کند که سبب از دست رفتن اسپرما-توژنیک، اسپرما-توژنر و آزادسازی زودهنگام اسپرما-توژنر به لومن لوله‌های منی‌ساز می‌شود (۳۱) که می‌تواند دلیلی در کاهش ارتفاع اپیتلیوم زایشی و تعداد سلول‌های جنسی در مطالعه حاضر باشد. همچنین کاهش سطح تستوسترون می‌تواند در روند اسپرما-توژنر اختلال ایجاد کرده و باعث تحلیل لایه‌های اپیتلیوم زایشی و کاهش قطر لوله‌های منی‌ساز شود (۳۲).

در این مطالعه افزایش معنی‌دار در حجم بافت بینابینی در گروه پارا-تیامول فنل نسبت به سایر گروه‌ها مشاهده شد که با مطالعه Shalaby که بر روی موش‌های بالغ با دوز ۱۰۰ mg/kg/day انجام شد مطابقت داشت (۳). تجمع مایع در بافت بینابینی منجر به

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر، افزایش در حجم بافت بینابینی، کاهش در قطر، ارتفاع و ضخامت غشای پایه لوله‌های منی‌ساز و نیز کاهش در میانگین کل تعداد سلول‌های سرتولی، اسپرما-توژنیک و اسپرما-توژنر دراز و گرد را در بافت بیشه موش‌هایی که پارا-تیامول فنل دریافت کرده بودند، نشان داد. نونایل فنل آلاینده‌ای زیست‌محیطی است که با تولید گوئنه‌های واکنش‌گر اکسیژن باعث ایجاد آسیب‌هایی در بافت‌های مختلف، از جمله بیشه می‌شود و اختلالاتی را در سیستم تولیدی‌مثلی و اندوکرینی بر جای می‌گذارد (۳). یکی از دلایلی که می‌توان برای اثرات مخرب پارا-تیامول فنل بر بافت بیشه ذکر کرد، اثر آن بر روی سیستم اندوکرینی است که باعث تغییر سطح هورمون‌های جنسی (۲۵) و به دنبال آن تغییر در اسپرما-توژنر و افزایش آپاپتوز در لایه‌های ژرمینال می‌شود (۲۶). با این حال، بیشترین اثر تخریبی نونایل فنل به خاصیت استرس اکسیداتیوی آن نسبت داده می‌شود. Chitra در مطالعه خود نشان دادند که نونایل فنل موجب کاهش فعالیت آنزیمه‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله گلوتاتیون ردوکتاز و سوپر اکسید دیسموتاز و الکا استرس اکسیداتیو در بافت بیشه رت‌ها می‌شود (۲۷). رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولیدشده در اثر استرس اکسیداتیو، اسیدهای چرب غیراشباع در غشا سلولی بیشه را مورد هدف حمله قرار می‌دهد که به نوبه خود باعث اختلال در غشا سلولی و آسیب سلولی می‌گردد (۳). بنابراین خصوصیات استروژنی و الکا استرس اکسیداتیو توسط پارا-تیامول فنل، در مجموع می‌تواند آسیب‌هایی را بر بافت بیشه ایجاد کند.

مشاهده شد که روغن سیاهدانه باعث افزایش قابل توجه آنزیمهای سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-PX) شده و سطح سرمی آمینوتانسفرازها و MDA را کاهش داده بود (۴۳). در مطالعه Ghliissi و همکارانش در سال ۲۰۱۲ تیمار رتهای نر آلوکسان با عصاره سیاهدانه  $200\text{ mg/kg/diet}$  به مدت ۳۰ روز سبب کاهش معنی دار سطح MDA در بافت های بیضه، اپی دیدیم، سینیال وزیکول و پروستات در مقایسه با گروه دیابتی شد (۸). همچنین تحقیقات مختلف نشان داده است که روغن سیاهدانه به عنوان آنتی اکسیدان قادر است از اثرات استرس اکسیداتیوی ناشی از تتراکلرید کربن (۴۴)، آلوکسان (۸) و آرسنیک (۴۲) بر بافت بیضه جلوگیری کند. برخی محققان گزارش کردند که سیاهدانه می تواند موجب افزایش سطح هورمون های LH و FSH و تستوسترون در حیوانات آزمایشگاهی شود (۴۵) بنابراین، با توجه به یافته های محققان و نتایج این مطالعه احتمالاً روغن سیاهدانه از طریق حفظ سطح هورمون های جنسی و کاهش استرس اکسیداتیو اثر حفاظتی خود را بر اسپرماتوژنر و بافت بیضه اعمال نموده باشد و می توان روغن سیاهدانه را به عنوان یک آنتی اکسیدان به منظور بهبود اثرات مخرب ایجاد شده توسط پارانوتایل فنل استفاده کرد و توصیه می شود. مصرف این روغن در برنامه غذایی بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

افزایش حجم بافت بینابینی بیضه شد. واژودیلاتور شدن رگ ها ناشی از اثر بازدارندگی پارانوتایل فنل در نفوذ  $\text{Ca}^{2+}$  به کانال های کلسیمی نوع L در سلول های ماهیچه ای صاف رگ ها (۴۰) و کاهش سطح تستوسترون به دنبال تیمار با نوتایل فنل، فضای بافت بینابینی را تحت تأثیر قرار داده، سبب آدم و افزایش وسعت بافت بینابینی بیضه گردید. آسیب در لایه اندولتیال عروق باعث اختلال در عملکرد عروق شده و مایعات را از جریان خون به بافت بینابینی بیضه آزاد کرده و موجب آدم بافت بینابینی می شود. سوم و تغییر سطح تستوسترون از جمله عواملی هستند که باعث افزایش حجم بافت بینابینی بیضه شد (۴۱).

در مطالعه حاضر روغن سیاهدانه در گروهی که متعاقب پارانوتایل فنل، روغن سیاهدانه دریافت کرده بودند؛ سبب شد تا افزایش حجم بافت بینابینی، کاهش قطر، ضخامت غشا پایه و ارتفاع اپی تلیوم زایشی لوله های منی ساز و نیز تعداد سلول های سرتولی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید دراز و گرد در حد گروه کنترل بهبود یابد. تیموکوکسیتون به عنوان ترکیب اصلی سیاهدانه، دارای خاصیت آنتی اکسیدانی است که توانایی جاروبگری رادیکال های آزاد، مهار پراکسیداسیون لیپیدی و حفظ مکانیسم های دفاع آنتی اکسیدانی در مواجهه با رادیکال های آزاد را دارد (۴۲). به طوری که در مطالعه ای که اثر روغن سیاهدانه در برابر سمیت  $\text{CCL}_4$  بررسی شده بود،

## References:

1. Labadie P, Budzinski H. Alteration of steroid hormone balance in juvenile turbot (*Psetta maxima*) exposed to nonylphenol, bisphenol A, tetrabromodiphenyl ether 47, diallylphthalate, oil, and oil spiked with alkylphenols. *Arch Environ Contam Toxicol* 2006;50(4):552–61.
2. Knez J. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. *Reprod Biomed Online* 2013;26(5):440–8.
3. Shalaby KA, Saleh EM. Ameliorative Effect of Honey Bee Propolis on the Nonylphenol Induced-Reproductive Toxicity in Male Albino Rats. *Aust J Basic Appl Sci* 2011; 5(11): 918-27.
4. Choi JS, Oh JH, Park HJ, Choi MS, Park SM, Kang SJ and et al. miRNA regulation of cytotoxic effects in mouse Sertoli cells exposed to nonylphenol. *Reproduc Biol Endocrinol* 2011; 9: 126.
5. Coldham NG, Sivapathasundaram S, Dave M, Ashfield LA, Pottinger TG, Goodall C and et al. Biotransformation, tissue distribution, and persistence of 4-nonylphenol residues in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Drug Metab Dispos* 1998; 26: 347–54.
6. Lani A. Designation of the Chemical Class Nonylphenol and Nonylphenol Ethoxylates as a Priority Chemical. Board of Environmental Protection. Bureau of Remediation and Waste Management. Adoption of Chapter 883. 2010.
7. Lee H J, Chattopadhyay S, Gong EY, Ahn RS, Lee K. Anti androgenic Effects of Bisphenol A and Nonylphenol on the Function of Androgen Receptor. *Toxicol Sci* 2003; 75: 40-6.
8. Ghliissi Z, Hamden K, Saoudi M, Sahnoun Z, Zeghal KM, El Feki A, et al. Effect of *Nigella sativa* seeds on reproductive system of male

- diabetic rats. *Afr J Pharm Pharmacol* 2012; 6(20): 1444 -50.
9. Gali-Muhtasib H, El-Najjar N, Schneider-Stock R. The medicinal potential of Black seed (*Nigella sativa*) and its components. *Adv Phytomedicine* 2006; 2: 133-53.
  10. Sharma NK, Ahirwar D, Jhade D, Gupta S. Medicinal & pharmacological potential of *Nigella sativa*. A review. *Ethnobotanical Rev* 2009; 13: 946-55.
  11. Tawfeek FKH, Ahmed SM, Kakel SJ. Effect of *Nigella sativa* oil treatment on the sex organs and sperm characters in rats exposed to hydrogen peroxide. *Mesopotamia J of Agric* 2006;34(1):1-7.
  12. De Jager C, Bornman MS, Vander Horst G. The effect of p-nonylphenol, an environmental toxicant with oestrogenic properties, on fertility potential in adult male rats. *Andrologia* 1999; 31: 99–106.
  13. Han XD, Tu ZG, Gong Y, Shen SN, Wang XY, Kang LN, et al. The toxic effects of nonylphenol on the reproductive system of male rats. *Reproductive Toxicol* 2004;19(2):215–221.
  14. Sangai NP, Verma RJ, Trivedi MH. Testing the efficacy of quercetin inmitigating bisphenol A toxicity in liver and kidney of mice. *Toxicol Industrial Health* 2012; 1–1.
  15. Soleimani Mehranjani M, Noorafshan A, Momeni H. R, Abnosi M. H, Anvari M, Hoseini SM. Stereological study of the effects of vitamin E on testis structure in rats treated with para-nonylphenol. *Asian J Androl* 2009; 11: 508–16.
  16. Howard C, Reed M. *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurment in Microscopy*. Oxford. United Kingdom: Bios Scientific Publishers; 1998.
  17. Noorafshan A, Karbalay-Doust S. Curcumin Protects the Seminal Vesicles from Metronidazole-induced reduction of secretion in mice. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2012; 55: 32–6.
  18. Hoseini L, Roozbeh J, Sagheb M, Karbalay-Doust S, Noorafshan A. Nandrolone decanoate increases the volume but not the length of the proximal and distal convoluted tubules of the mouse kidney. *Micron* 2009; 40(2): 226-30.
  19. Noorafshan A, Karbalay-Doust S, Valizadeh A, Aliabadi E, Mirkhani H. Ameliorative Effects of Curcumin on the Seminiferous Epithelium in Metronidazole-Treated Mice: A Stereological Study. *Toxicol Pathol* 2010; 38: 366-71.
  20. Dalgaard M, Pilegaard K, Ladefoged O. In utero exposure to diethylstilboestrol or 4n-nonylphenol in rats: number of sertoli cells, diameter and length of seminiferous tubules estimated by stereological methods. *Pharmacol Toxicol* 2002; 90(2): 59-65.
  21. Ferrando RE, Nyengaard JR, Hays SR, Fahy JV, Woodruff PG. Applying stereology to measure thickness of the basement membrane zone in bronchial biopsy specimens. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112(6): 1243-5.
  22. Peng B, Zhang RD, Dai XS, Deng XZ, Wan Y, Yang ZW. Quantitative (stereological) study of the effects of vasectomy on spermatogenesis in rhesus monkeys. *Macaca mulatta Reproduc* 2002; 124(6): 847-56.
  23. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology* 1990; 186: 407-21.
  24. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 1978; 52: 302-10.
  25. O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 2001; 22(3): 289–318.
  26. McClusky LM, De Jager C, Bornman MS. Stage-related increase in the proportion of apoptotic germ cells and altered frequencies of stages in the

- spermatogenic cycle following gestational, lactational, and direct exposure of male rats to p-nonylphenol. *Toxicol Sci* 2007; 95: 249–56.
27. Chitra KC, Mathur PP. Vitamin E prevents nonylphenol induced oxidative stress in testis of rats. *Indian J Exp Biol* 2004; 42: 220–3.
28. Franca LR, Russell LD. The testes of domestic animals. In: Male Reproduction. A Multidisciplinary Overview. (eds J. Regadera, R. Martinez-Garcia), Madrid: Churchill Livingstone 1998: 197–219.
29. Kovačević K, Budolfeld T, Majdić G. Reduced seminiferous tubule diameter inMice neonatally exposed to perfume. *Slov Vet Res* 2006; 43 (4): 177-83.
30. Varghese AC, duPlessis SS, Agarwal A. Effect of endocrine disrupting chemicals on sertoli cell function. *Reproduct Bio Med* 2008; 17 (6): 866–80.
31. Jedlinska-Krakowska M, Bomba G, Jakubowski K, Rotkiewicz T, Jana B, Penkowski A. Impact of Oxidative Stress and Supplementation with Vitamins E and C on Testes Morphology in Rats. *J Reproduc Develop* 2006; 52(2): 203-9.
32. Gurmeet K, Rosnah I, Normadiah MK, Das S, Mustafa AM. Detrimental effects of bisphenol A on development and functions of the male reproductive system in experimental rats. *EXCLI J* 2014;13:151–60.
33. Han XD, Tu ZG, Gong Y, Shen SN, Wang XY. The toxic effects of nonylphenol on the reproductive system of male rats. *Reprod Toxicol* 2004 b; 19: 215–21.
34. Choi M-S, Park H-J, Oh J-H, Lee E-H, Park S-M, Yoon S. Nonylphenol-induced apoptotic cell death in mouse TM4 Sertoli cells via the generation of reactive oxygen species and activation of the ERK signaling pathway. *J Appl Toxicol* 2014;34(6):628–36.
35. Kato M, Makino S, Kimura H, Ota T, Furuhashi T, Nagamura Y. Sperm motion analysis in rats treated with adriamycin and its applicability to male reproductive toxicity studies. *J Toxicol Sci* 2001; 26(1): 51-9.
36. Soleimani Mehranjani M, Taefi R. The protective role of vitamin E on the testicular tissue in rats exposed to sodium arsenite during the prenatal stage till sex maturity: A stereological analysis. *Iran J Reprod Med* 2012; 10(6): 571-80.
37. Guillette LJ. Endocrine disrupting contaminants-beyond the Dogma. *Environ Health Perspect* 2006;114: 9-12.
38. Gayton and Hall. 2<sup>nd</sup> ed.teachers translate medical universities in Iran. Tehran: Tehran Textbook of Medical Physiology;2006.
39. Paulsson M. Basement membrane Proteins: Structure, assembly, and cellular interaction. *Critical Rev Biochem Molecular Biol* 1992; 27: 93-127.
40. Ruehlmann DO, Steinert JR, Valverde MA, Jacob R, Mann GE. Environmental estrogenic pollutants induce acute vascular relaxation by inhibiting L-type Ca<sup>2+</sup> channels in smooth muscle cells. *FASEB J* 1998;12(7): 613-9.
41. Lirdi LC, Stumpf T, Sasso-Cerri E, Miraglia SM. Amifostine protective effect on cisplatin-treated rat testis. *Anat Rec (Hoboken)* 2008;291(7):797–808.
42. Fouad A, Albuali W, Jresat I. Protective Effect of Thymoquinone against Arsenic-Induced Testicular Toxicity in Rats. *Int J Med Pharmaceutical Sci Engineering* 2014;8 (2): 92-5.
43. İlhan N, Seckin D. Protective Effect of Nigella sativa Seeds on CCL4-Induced Hepato Toxicity. *F.Ü. Sağlık Bil Dergisi* 2005;19(3): 175-9.
44. Danladi J, Ahmed SA, Akpulu SP, Owolagba GK, Iduh MU, Mairiga AA. Protective effect of cool extraction of Black Seed (Nigella Sativa) oil

- against CCl<sub>4</sub>-Induced oxidative damages in wistar rats testis. IOSR-J Pharm Bio Sci 2013;5:68–74..
45. Yan L, Bai X, Fang Z, Che L, Xu S, Wu D. Effect of different dietary omega-3/omega-6 fatty acid ratios on reproduction in male rats. Lipids Health Dis 2013;12:33.

## STEREOLOGICAL STUDY ON THE PROTECTIVE EFFECT OF *NIGELLA SATIVA* OIL ON THE MICE TESTIS TISSUE FOLLOWING PARA-NONYLPHENOL INDUCED TOXICITY

*Malek Soleimani Mehranjani<sup>1\*</sup>, Mohammad Ali Shariatzadeh<sup>2</sup>, Arezoo Solati<sup>3</sup>*

*Received: 7 Apr, 2016; Accepted: 18 Jun, 2016*

### **Abstract**

**Background & Aims:** Para-Nonylphenol (p-NP) is an estrogenic compound with toxic effects on the various organs including testis. The purpose of this investigation was to study the toxic effects of p-NP on the testis tissue of mice and evaluation of the effect of *Nigella sativa* oil (NSO) against this toxicity

**Materials & Methods:** This study was conducted on 24 adult male NMRI mice ( $32\pm3$  g) that were divided into 4 groups (n=6), control, NSO (5mg/kg/day), p-NP (250mg/kg/day) and p-NP + NSO, and treated orally for 34 days. Finally, mice were sacrificed, their right testis were taken out, fixed, sectioned, processed and stained using Heidenhain' & azan method. Testicular tissue sections were evaluated using stereological method. Lipid peroxidation index, malondialdehyde (MDA) level, was also measured in serum of mice. The data were statistically analyzed using one way ANOVA and difference means was considered significant at  $P<0.05$ .

**Results:** A significant decrease in the diameter ( $P<0.008$ ), height of the germinal epithelium ( $P<0.007$ ), the thickness of the basement membrane ( $P<0.05$ ) of the seminiferous tubules, the total number of long and round spermatids, spermatocytes, spermatogonia and sertoli cells ( $p<0.001$ ) and also a significant increase in the MDA level ( $p<0.001$ ) was observed in the p-NP group compared to the control. The above parameters were significantly compensated in the p-NP+NSO group to the control level ( $P<0.05$ ).

**Conclusion:** NSO has a protective effect on the p-NP toxicity in the mice testis therefore it can be suggested as a raputic supplement in preventing the adverse effects of p-NP exposure in industrial zones.

**Keywords:** Stereology, Testis, Para- nonylphenol, *Nigella sativa* oil, Mice

**Address:** Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

**Tel:** +989181617098

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

SOURCE: URMIA MED J 2016: 27(6): 514 ISSN: 1027-3727

---

<sup>1</sup> Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran (Corresponding Author)

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

<sup>3</sup> Master in Developmental Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran