

مطالعه استریولوژیکی اثر ویتامین C بر بافت بیضه در رتهای تیمار شده با بیس فنل آ.

محمد حسن رفیعی^۱، سید محمد علی شریعت زاده^۲

^۱ کارشناسی ارشد سلولی تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک. اراک. ایران (نویسنده مسئول)

^۲ استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

چکیده

بیس فنل a یک آلاینده زیست محیطی است که موجب القاء استرس اکسیداتیو می گردد. در این مطالعه اثر ویتامین C به عنوان یک آنتی اکسیدان موثر و از بین برنده رادیکال های آزاد، بر بافت بیضه رت بدنبال تیمار با بیس فنل آ مورد بررسی استریولوژیکی قرار گرفت. تعداد ۲۴ سر رت نر نژاد ویستار با میانگین وزنی 218 ± 15 گرم به طور تصادفی در ۴ گروه (۶= کنترل، ویتامین C (۱۰۰ mg/kg/day)، بیس فنل $60 \mu\text{g/kg/day}$ (و بیس فنل آ + ویتامین C تقسیم شد. پس از ۵۶ روز تیمار دهانی و با تعیین وزن رتها، بیضه راست خارج و فیکس شد پس از انجام برش گیری، پاساژ بافتی و با روش هایدن هان آزان رنگ آمیزی شد و حجم کل بیضه، حجم لوله های منی ساز، ارتفاع اپیتلیوم زایشی، قطر و طول لوله های منی ساز، ضخامت غشاء پایه لوله های منی ساز، تعداد سلول های اسپرماتوگونی نوع A و B، اسپرماتوسیت و اسپرماتید و سلول های سرتولی توسط تکنیک استریولوژی تخمین زده شد. داده ها با روش آنالیز واریانس یکطرفه آنالیز و تفاوت میانگین ها در حد $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد. در این پژوهش میانگین حجم لوله های منی ساز، ارتفاع اپیتلیوم زایشی، قطر لوله های منی ساز، ضخامت غشاء پایه لوله های منی ساز، تعداد سلول های اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سلول های سرتولی نسبت در گروه بیس فنل آ نسبت به گروه کنترل کاهش معنی دار و حجم بافت بینابینی افزایش معنی داری را ($P < 0.05$) نشان داد. در حالیکه ویتامین C در گروه بیس فنل آ + ویتامین C باعث بهبود پارامترهای مذکور به حد گروه کنترل شد. نتایج این پژوهش نشان داد که ویتامین C توانست اثرات نامطلوب بیس فنل آ بر بافت بیضه را تا حد زیادی جبران کند. بنابراین می توان ویتامین C را به عنوان یک مکمل در مسمویت های ناشی از بیس فنل آ استفاده کرد.

واژه های کلیدی: استریولوژی، بیضه، بیس فنل آ، رت، ویتامین C

مقدمه

مسئله آلودگی یکی از مهمترین و حادثترین مسائل ناشی از تمدن انسانی در جهان امروز به شمار می رود، چرا که از اعماق چند هزار متری زمین گرفته تا معادن، آبهای تحت الارضی، بیوسفر، تروپوسفر و حتی در داخل هواپیماهای بلند پرواز و جو خارجی زمین، چرخه و سیستم حیات را مورد تهدید قرار داده است. مولکول آلاینده ای که امروز از کارخانه یا منبع آلوده کننده دیگری مثلاً در اروپا، وارد محیط می شود اگر تجزیه نشود یا تغییر شکل ندهد احتمالاً بعد از چندی می تواند در ریه انسانهایی که در قلب جنگلهای آفریقا یا دشتهای وسیع آسیا زندگی می کنند وارد شود. آلودگی برای افراد مختلف مفهوم و معنی متفاوتی دارد. مردم معمولی ممکن است تحریک چشم ناشی از یک گاز یا آب آلوده را آلودگی به حساب آورند. برای کشاورزی که یک عامل به گیاهان یا حیواناتش آسیب می رساند آلودگی محسوب می شود اما هر گاه بخواهیم تعریف جامع و کلی برای آلودگی محیط زیست در نظر بگیریم چنین می توان گفت که آلودگی محیط عبارت است از «وجود یک یا چند ماده آلوده کنند در محیط زیست به مقدار و مدتی که کیفیت یا چرخه طبیعی را بطوری که مضر به حال انسان یا حیوان، گیاه و یا آثار و ابنیه باشد تغییر دهد. به بیان ساده تر هر گاه ماده یا موادی بیگانه با غلظتی خاص وارد عناصر محیطی شوند و تعادل طبیعی آنها را بر هم بزنند صحبت از آلودگی می شود. عوامل آلودگی محیط زیست را می توان در دو دسته کلی تقسیم بندی کرد دسته اول آلاینده های طبیعی مثل خاکسترهای آتشفشانی، گرد و غبار ناشی از طوفانها و ... و دسته دوم آلاینده های مصنوعی که ساخته دست بشر است و به شکل های گوناگون تولید و وارد چرخه طبیعت می شود و آثار مخرب خود را با توجه به نوع و غلظتشان بر بخشهای مختلف بدن انسان و سایر جانداران وارد می نمایند. یکی از دستگاه های هدف آلاینده های زیست محیطی در بدن جانوران دستگاه تولید مثل است. در این پژوهش به تاثیر یکی از آلاینده های زیست محیطی مصنوعی به نام بیس فنل آ بر بیضه رت نر نژاد وِستار می پردازیم و بررسی خواهیم کرد که آیا می توان با ریز مغذی به نام ویتامین C مانع از آثار تخریبی آن شد. این پژوهش ضمن تخمین اجزای ساختمان بیضه از قبیل وزن رت و بیضه، حجم کل بیضه، حجم لوله های منی ساز و بافت بینابینی، طول و قطر لوله های منی ساز همچنین ضخامت غشاء پایه و ارتفاع اپیتلیوم زایشی و تعداد سلول های اسپرماتوگونی (نوع A و B)، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سرتولی، به بررسی آثار بیس فنل آ بر بافت بیضه نیز می پردازد و پس از اندازه گیری و محاسبه میانگین پارامترهای ذکر شده در بالا در تمامی گروه های کنترل و تیمار، این پارامترها در گروه های مختلف با یکدیگر مقایسه و داده ها پس از آنالیز آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار خواهند گرفت.

دستگاه تناسلی رت نر

دستگاه تناسلی نر شامل بیضه ها، مجاری تناسلی داخلی و خارجی بیضه، غدد ضمیمه و آلت تناسلی می باشد (شکل ۱-۱). این دستگاه در تولید و ساخت سلول های جنسی و هورمون های مربوطه و انتقال آنها به خارج نقش دارد. بیضه یک غده مختلط است که تولیدکننده هورمون های جنسی نر و اسپرم می باشد (Pousti, ۲۰۰۳). هر بیضه، جسمی بیضی شکل است که اندازه ی آن در رت ۱-۱/۵ cm در طول و ۰/۱-۸ cm در عرض است (Simmons, ۲۰۰۸). پوست و پرده ی صفاقی، بخشی را به نام کیسه بیضه (اسکروتوم) تشکیل می دهند. این بافت در مرحله جنینی در پشت پرده صفاق و مجاور دیوار خلفی حفره شکم رشد می کند و بعداً در حالیکه دو لایه ای از پرده صفاق هر بیضه را احاطه کرده است به کیسه بیضه منتقل می شود. در یک رت جوان، بیضه ها در ۴-۶ هفته پس از تولد در کیسه بیضه ای نزول می کنند. رت در طول زندگی خود قادر به انتقال بیضه به حفره شکمی و کیسه بیضه ای است (Simmons, ۲۰۰۸). زیر کیسه بیضه و به عبارت دیگر اطراف بیضه را کپسول ضخیمی از بافت همبند متراکم سرشار از رشته کلاژن احاطه نموده است که به نام سفید پرده (Tunica albuginea) خوانده می شود. سطح داخلی کپسول را بافت همبند پرعروقی پوشانده که به نام طبقه عروقی (tunica vasculosa) مرسوم است. هر بیضه بوسیله یک کپسول ضخیم از جنس بافت همبند متراکم به نام پوشش سفید یا تونیکا

آلبوژینه‌آ احاطه شده است. تونیکا آلبوژینه‌آ در سطح خلفی بیضه ضخیم شده و میان پرده بیضه (Mediastinum testis) را تشکیل می‌دهد که از آن، دیواره‌ای فیبری به درون بیضه نفوذ کرده ولی به آلبوژینه مقابل متصل نمی‌شود، و آن را به حدود ۲۵۰ بخش هرمی شکل موسوم به لوبول‌های بیضه (Testicular tubules) تقسیم می‌کند. هر لوبول به وسیله چند لوله پیچ و خم دار به نام لوله‌های منی ساز اشغال شده که در یک غشای همبندی شل که از نظر عروق خونی و لنفاوی و اعصاب و سلول‌های بینابینی (لیدیگ) غنی است، قرار دارند. اسپرم‌ها در اپیتلیوم زایشی لوله‌های منی ساز تولید می‌شوند که این لوله‌ها یک طرفشان بسته و از طرف دیگر، وارد لوله‌های راست کوتاهی، به نام، لوله‌های مستقیم می‌شوند که انتهای باز هر لوله منی ساز را به سیستمی از فضای لابیرنتی در مدیاستن بیضه به نام شبکه بیضه متصل می‌کنند. اسپرم‌ها در شبکه‌ی بیضه‌ای از راه ۱۰ تا ۲۰ لوله‌ی کوتاه به نام مجرای وبران ductulus efferens وارد بخش سفالیک (سری) اپیدیدیم می‌شوند. اپیدیدیم، مجرای منفرد پیچ خورده به طول ۴ تا ۶ متر است. و شامل بخش‌های سر، تنه و دم است در اپیدیدیم مایع منی که حاوی اسپرم‌هاست تغلیظ می‌شود و اسپرم‌ها بالغ شده و متحرک می‌شوند. در ادامه مایع منی وارد مجرای دفران (ductus deferens) می‌شود. مجرای دفران لوله‌ای مستقیم با یک دیواره ضخیم است که از اپیدیدیم تا پیشابراه پروستاتی ادامه یافته و در آن تخلیه می‌شود. این ساختمان با یک مجرای باریک و یک مخاط با چین خوردگی‌های طولی مشخص می‌شود که در بیشتر طولش، به وسیله بافت پوششی استوانه‌ای مطبق کاذب حاوی مژک‌های ثابت پوشیده شده است (Junqueira, ۲۰۰۷).

شبکه‌ی عروقی بیضه‌ها از سرخرگ بیضه‌ای مشتق می‌شود که در امتداد مجرای دفران به همراه بیضه به کیسه‌ی بیضه نزول می‌کند. سرخرگ بیضه‌ای پیش از ورود به کپسول بیضه انشعابات فراوانی را تشکیل می‌دهد تا عناصر عروقی داخل بیضه‌ای را به وجود آورند. بسترهای مویرگی بیضه‌ها به چندین سیاهرگ به نام شبکه‌ی سیاهرگی پیچک مانند (Pampiniform plexus of veins) که پیرامون سرخرگ بیضه‌ای پیچیده شده‌اند، تخلیه می‌شود. سرخرگ، سیاهرگ‌ها و مجرای دفران در مجموع بند بیضه را تشکیل می‌دهند که از راه کانال مغابنی از حفره‌ی شکمی عبور کرده و وارد کیسه‌ی بیضه می‌شوند (Gartner, ۲۰۰۶). مویرگ‌های بیضه منفذدار بوده و به طیف گسترده‌ای از مولکول‌های پلاسما، حتی مولکول‌های بزرگ اجازه عبور می‌دهند تا به بخش‌های دیگر بافت بینابینی وارد شود (de Kretser and Kerr, ۱۹۹۸). بیشتر حجم بیضه از لوله‌های منی ساز تشکیل یافته که این لوله‌ها از یک اپیتلیوم پیچیده مطبق به نام اپیتلیوم زایشی یا منی ساز مفروش شده‌اند. و شامل لومن پر از مایع می‌باشند که درون آنها اسپرماتوزوئید تشکیل یافته وارد می‌شود. لوله‌های منی ساز بوسیله بافتی بینابینی که شامل گروهی از سلول‌های لیدیگ، رگ‌های خونی، لنفوسیت‌ها و عصب است، از هم مجزا می‌شوند. دیواره خارجی لوله‌های منی ساز توسط یک لایه‌ی قاعده‌ای کاملاً مشخص و یک بافت همبند رشته‌ای متشکل از چندین لایه فیبرپلاست احاطه شده است. داخلی‌ترین لایه که به لایه قاعده‌ای چسبیده است، از سلول‌های شبه عضلانی مسطحی به نام سلول‌های میوئید تشکیل شده است. این سلول‌ها خصوصیات سلول‌های عضله صاف را از خود نشان می‌دهند. سلول‌های بینابینی (لیدیگ) قسمت عمده فضایی میان لوله‌های منی ساز را اشغال می‌کنند (Junqueira, ۲۰۰۷). بافت پوششی منی ساز حاوی دو نوع سلول است: سلول‌های سرتولی یا سلول‌های پشتیبان و سلول‌هایی که دودمان اسپرماتوزن را تشکیل می‌دهند. سلول‌های دودمان اسپرماتوزن شامل سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A و B، اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه و اسپرماتیدهاست که مراحل مختلف اسپرماتوزن را نشان می‌دهند. از سلول‌های بافت پوششی منی ساز، سلول سرتولی و از دودمان اسپرماتوزن، سلول اسپرماتوگونی در تماس مستقیم با بازال لامینا قرار دارند (Junqueira, ۲۰۰۷).

مروری بر تحقیقات انجام شده

بررسی Yoshiro و همکارانش در سال ۲۰۰۵ نشان داد که دوز $200 \mu\text{g/kgbw/day}$ و $200 \mu\text{g/kgbw/day}$ BPA بر روی موشهای سوری و رت اثری مشابه دارد و مطالعات میکروسکوپی بیانگر حالتی غیر نرمال در اسپرماتیدها بود، مثلاً وزیکول آکروزوم، کلاه آکروزوم، و هسته اسپرماتیدها تغییر شکل یافتند و اتصالات بین سلول‌های سرتولی و اسپرماتیدها نیز دچار دگرگونی و تغییراتی نابجا شدند (Yoshiro et al., ۲۰۰۵). گاوژ رت‌های ماده باردار از روز ششم تا روز بیستم بارداری با

دوزهای $4,400 \text{ mg/kgbw/day}$ از BPA باعث کاهش سطح تستوسترون زاده های نر آنها نسبت به افراد گروه کنترل شد که این امر بیانگر کاهش فعالیت یا کاهش تعداد سلولهای بینابینی می باشد (Watanabe et al., ۲۰۰۳). کمبود ویتامین C در انسان با کاهش تعداد اسپرم، افزایش تعداد اسپرمهای غیر طبیعی و کاهش باروری همراه است (Dawson et al., ۱۹۹۰). از سوی دیگر، Sonmez و Demirci در سال ۲۰۰۳ گزارش داد که تزریق عضلانی ۲۰ میلی گرم اسید اسکوربیک به ازای هر کیلوگرم وزن به مدت ۳۰ روز باعث افزایش حجم مایع منی، غلظت اسپرم و تحرک اسپرم قوچ، و همچنین افزایش غلظت آن در پلاسمای خون و سمینال می شود (Sonmez and Demirci., 2003). بررسی های Zan و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در تایید این مطلب نشان داد که افزودن آسکوربیک اسید به ظروف محتوی خون باعث افزایش غلظت شاخصهایی چون ATP و کاهش یون پتاسیم ($+K$) موجود در محلول گشته و نیز غلظت رادیکال سوپر اکسید را به میزان زیادی کاهش می دهد (Zan et al., ۲۰۰۵).

مطالعات پیشین نشان داده است که تجویز دهانی اسید اسکوربیک ممکن است باعث کاهش خطر مسمومیت فلزات سنگین شود (Dalley et al., ۱۹۹۰). بر اساس نتایج حاصل از مطالعات انجام شده در رت، اسید اسکوربیک باعث کاهش جذب روده ای سرب و افزایش فیلتراسیون کلیوی آن می شود (Suzuki and Yoshida., ۱۹۷۹; Morton., ۱۹۸۵). اسید اسکوربیک با افزایش جذب آهن در دئودنوم و بدلیل رقابت آهن با سرب در جذب، باعث کاهش جذب سرب می گردد (Suzuki and Yoshida., ۱۹۷۹). مطالعات بر روی انسان و حیوانات نشان داده است که اسید اسکوربیک در کاهش میزان جذب سرب، افزایش حذف شدن سرب از بدن (Dhawan et al., ۱۹۸۸) و کاهش خاصیت سمی سرب (Onunkwor et al., ۲۰۰۴) نقش دارد. در آزمایشی که توسط Stojiljkovic و همکارانش در سال ۲۰۱۰ بر روی بافت کلیه رتهای بالغ ویستار انجام شد، مشخص شد که جنتامایسین به وسیله کاهش دادن سطح آنتی اکسیدانها و افزایش شکل گیری رادیکال های آزاد، سبب آسیب های اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدها می شود. در جریان استفاده همزمان از ویتامین C با دوز 200 mg/kg و جنتامایسین با دوز 100 mg/kg ، سمیت کلیوی جنتامایسین، ایجاد نشد (Stojiljkovic et al., ۲۰۱۰). سطح ۸-اکسو-۷ و ۸-دی هیدرو ۲' - داکسی گوانینوزین، که یکی از محصولات اصلی آسیب های اکسیداتیو در DNA سلول است، توسط Cesar و همکارانش در سال ۱۹۹۱ در مردان سیگاری اندازه گیری شده است. نتایج نشان داده که سطح بالای این محصول با کاهش سطح ویتامین C پلاسمای سمینال همبستگی دارد (Cesar et al., ۱۹۹۱). آزمایش Acharya و همکارانش در سال ۲۰۰۸ مشخص کرد، مصرف 10 mg/kgbw/day ویتامین C و 100 mg/kgbw/day ویتامین E در موش های Swiss تیمار شده با 1 mg/kgbw/day کادمیوم موجب کاهش پراکسیداسیون لیپید و افزایش تعداد اسپرمها نسبت به گروه تیمار شده با کادمیوم می شود (Achayra et al., ۲۰۰۸).

Sapra و همکارانش در سال ۱۹۸۷ مشاهده کردند که قطع ویتامین C از رژیم غذایی خوکچه هندی بعد از ۶ هفته، باعث تغییرات در بافت بیضه می شود، به گونه ای که قطر لوله های اسپرم ساز و ضخامت اپیتلیوم زایشی کاهش یافت. خوکچه هندی همانند انسان توان سنتز ویتامین C را ندارد (Sapra et al., ۱۹۸۷). آزمایشی دیگر توسط Das و همکارانش در سال ۲۰۰۲ نشان داد که وزن بیضه و اندامهای ضمیمه جنسی با سیکلوفسفامید به طور معنی داری کاهش می یابد. در این مطالعه که بر روی رتهای نر ویستار بالغ به مدت ۲۸ روز انجام شد، رت ها را به سه گروه تقسیم کردند، در گروه اول به ازای هر کیلو گرم وزن بدن ۵ میلی گرم سیکلوفسفامید را در ۵ میلی لیتر آب به طور روزانه حل کرده و گاواژ دادند. به گروه دیگر همین مقدار سیکلوفسفامید را همراه 25 mg/kgbw/day ویتامین C خوراندن و گروه سوم گروه کنترل بود. ویتامین C باعث برگشت کاهش وزن بیضه و اندامهای ضمیمه جنسی نسبت به گروه سیکلوفسفامید شد (Das et al., ۲۰۰۲). در آزمایش دیگری، خوراندن ویتامین C در دوز 10 mg/kgbw/day و لیندان (lindane) در دوز 20 mg/kgbw/day به موشهای نر Mus musculus با وزن $5 \pm 30 \text{ g}$ ، به مدت ۳۰ روز و ۶۰ روز باعث شد که ساختار لوله های اپیدیدم و مجرای دفران در گروه ویتامین C و لیندان، نسبت به گروه لیندان، حالت نرمال خود را حفظ نمایند (Varsha and Vinoy., ۲۰۱۱). بررسی های Bindhumol و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نشان داد که تیمار دهانی رتهای بالغ با دوز 40 mg/kgbw/day آسکوربیک

اسید و $20 \mu\text{g/kgbw/day}$ بیس فنل آ، به مدت ۳۰ روز، اثرات اکسیداتیو استرس بیس فنل آ را کاهش داد و همچنین سطح آنزیمهای آنتی اکسیدان افزایش یافت (Bindhumol et al., ۲۰۰۳). Sarita و همکارانش در سال ۲۰۱۲ در تحقیقی، ۱۵۰ ماهی *Cirrhinus mrigala* با وزن $60 \pm 5 \text{g}$ را در سه گروه، گروه اول به عنوان شاهد، گروه دوم 2mg/L بیس فنل آ، و گروه سوم 50mg/L ویتامین C و 2mg/L بیس فنل آ به مدت ۳۰ روز تیمار دادند، پس از بررسی بافت کبدی مشخص شد که بیس فنل آ باعث واکنش شدن و نکروز در بافت کبد می شود اما در گروه ویتامین C و بیس فنل آ، ویتامین C آثار تخریبی بیس فنل آ را کاهش داد (Sarita et al., ۲۰۱۲). در جریان استفاده همزمان از ویتامین C با دوز 40mg/kgbw/day و بیس فنل آ با دوز $20 \mu\text{g/kgbw/day}$ برای تیمار رت های نر strain ۴۵ روزه به مدت ۶۰ روز، افزایش سطح گلوکوتایون پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز مشاهده شد در حالیکه سطح این دو آنزیم در گروه بیس فنل آ نسبت به گروه کنترل پایینتر و معنی دار بود و این دلالت بر نقش مستقیم این ویتامین در برابر آسیب های اکسیداتیو می باشد (Chitra et al., ۲۰۰۳). همچنین بعضی سموم مثل سیس پلاتین در دوز 1mg/kgbw/day موجب کاهش قطر لوله های منی ساز، کاهش ضخامت اپیتلیوم زایشی و کاهش تعداد اسپرم شد اما ویتامین C با دوز 10mg/kgbw/day از اثرات سیس پلاتین جلوگیری کرد و شاخص های مورد نظر را در حد گروه کنترل حفظ کرد (Narayana et al., ۲۰۰۹).

مواد و روش تحقیق

در این پژوهش، به منظور بررسی تأثیر بیس فنل آ (BPA) و ویتامین C بر ساختار بیضه در رت های نر بالغ، از ۲۴ سرت نر نژاد ویستار استفاده شد. حیوانات از مؤسسه پاستور ایران تهیه و به مدت دو هفته برای تطابق با محیط در شرایط استاندارد (دمای 21 ± 2 درجه سانتی گراد، چرخه نوری ۱۲ ساعته، دسترسی آزاد به آب و غذا) در حیوان خانه دانشگاه اراک نگهداری شدند. حیوانات به چهار گروه تقسیم شدند: کنترل، تیمار با ویتامین C، تیمار با بیس فنل آ (BPA)، تیمار ترکیبی بیس فنل آ + ویتامین C. برای شناسایی حیوانات از روش برچسب گذاری گوش استفاده شد. بیس فنل آ (با خلوص ۹۹٪) و ویتامین C هر دو از شرکت Sigma-Aldrich تهیه شدند. به علت انحلال پذیری پایین BPA در آب، ابتدا در اتانول ۹۶ درصد حل شده و سپس با روغن ذرت رقیق شد. دوز مصرفی BPA برابر ۶۰ میکروگرم/کیلوگرم و دوز ویتامین C برابر ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم در روز بود. تیمار به مدت ۲ ماه و به صورت خوراکی (گاواژ) انجام شد. برای یکسان سازی شرایط، همه گروه ها از طریق گاواژ و با روغن ذرت تیمار شدند.

نمونه برداری و تشریح: در پایان دوره تیمار، حیوانات با دی اتیل اتر بیهوش شدند. بیضه ها از طریق باز کردن اسکروتوم راست خارج شدند. وزن تر و حجم بیضه ها از طریق روش شناورسازی اندازه گیری شد.

بیضه ها پس از شستشو در نرمال سالین، در محلول فیکساتیو MDF قرار گرفتند و به مدت یک هفته در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس با روش برش گیری تصادفی ایزوتروپیک (IUR) آماده سازی شدند تا دقت نمونه برداری فضایی حفظ شود. از این برش ها با استفاده از تروکار، قطعات گرد تهیه و برای بررسی میزان چروکیدگی اندازه گیری شدند. قطعات به صورت استاندارد در پارافین قالب گیری و به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق نگهداری و سپس در یخچال ذخیره شدند. فرآیند پاساژ بافتی شامل آب گیری با الکل های صعودی، شفاف سازی با زایلین و آغشته سازی با پارافین انجام شد. پس از قالب گیری، بلوک ها توسط میکروتوم برش داده شدند. برای تحلیل های مختلف از برش های ۵ و ۲۰ میکرونی استفاده گردید. رنگ آمیزی با روش هایدن هان آزان (Heidenhain's Azan) انجام شد تا اجزای مختلف بافت بیضه به وضوح قابل مشاهده باشد.

تحلیل های بافت شناسی و استریولوژیک: محاسبه چروکیدگی بافت بیضه، حجم واقعی بیضه، محاسبه حجم لوله های منی ساز و بافت بینابینی، طول لوله های منی ساز، قطر لوله های منی ساز، ارتفاع اپیتلیوم زایشی، ضخامت غشاء پایه، تعداد سلول های اسپرماتوژنی و سرتولی.

یافته های پژوهش

وزن رت

براساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر، از مقایسه‌ی میانگین وزن رت‌ها در پایان دوره تیمار اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P < 0.05$). این نتیجه نشان دهنده این است که دوز $60 \mu\text{g/kg/day}$ به مدت ۲ ماه تاثیر قابل توجهی در تغییر وزن بدن رت‌های بالغ ندارد. مطالعات صورت گرفته در گذشته نیز یافته ما را تأیید می‌کند؛ به عنوان مثال: در مطالعه Yamasaki و همکارانش در سال ۲۰۰۲ بر روی رت‌ها، که با دوز $40,200 \text{ mg/kgbw/day}$ از BPA به مدت ۲۸ روز تحت تیمار قرار گرفتند، وزن بدن کاهشی نشان نداد (Yamasaki et al., ۲۰۰۲). در مطالعه Vom Saal و همکارانش در سال ۱۹۹۸ بر روی موشهای CF-۱، که با دوز 0.02 mg/kgbw/day از BPA به مدت ۲۳ روز تحت تیمار قرار گرفتند، وزن بدن کاهشی نشان نداد (Vom Saal et al., ۱۹۹۸). در مطالعه Xiaohong و همکارانش در سال ۲۰۱۱ بر روی موشهای ۳۲ روزه و ۹۰ روزه، که با دوزهای ۴۰ و $400 \mu\text{g/kg/day}$ از BPA تحت تیمار قرار گرفتند، وزن بدن کاهشی نشان نداد. (Xiaohong et al., ۲۰۱۱). محققان علت کاهش وزن بدن رت را در برخی رت‌های تیماری با مواد شیمیایی سمی، کم شدن مصرف غذا در نتیجه بی‌اشتهایی رت‌های تیمار شده با این مواد دانسته‌اند (Hanadi et al., ۲۰۱۱). ولی گزارشی صورت نگرفته که BPA با دوز $60 \mu\text{g/kg/day}$ منجر به بی‌اشتهایی حیوان و در نهایت کم شدن وزن بدن شده باشد.

وزن بیضه

در این مطالعه میانگین وزن بیضه در بین گروههای مختلف تیمار و کنترل تغییرات معنی‌داری را نشان نداد ($P < 0.05$). همین نتایج در بیشتر تحقیقات انجام گرفته توسط محققان دیگر نیز به دست آمده است. در مطالعه Tinwell و همکارانش در سال ۲۰۰۲ بر روی رت‌های ویستار بالغ، که با دوزهای 0.02 ، 50 ، 500 mg/kg/day از BPA به مدت ۲۱ روز تحت تیمار دهانی قرار گرفتند، تغییری در وزن مطلق بیضه مشاهده نشد (Tinwell et al., ۲۰۰۲). در بررسی دیگری با دوز $50 \mu\text{g/kg/day}$ از BPA بر روی رت‌ها، که از سن ۱۲ هفتگی تا ۱۹ هفتگی تحت تیمار به روش تزریق داخل صفاقی، بوده‌اند، نیز تغییری در وزن مطلق بیضه رت‌ها مشاهده نشد (Saito et al., ۲۰۰۳). تیمار رت‌های نر ویستار با BPA در دوزهای $40,200 \text{ mg/kgbw/day}$ به مدت ۲۸ روز در وزن بیضه تغییری ایجاد نکرد (Yamasaki et al., ۲۰۰۲).

در بررسی دیگر تیمار رت‌های SD، ۲۳ روزه با دوز 100 mg/kg/day از BPA و به روش دهانی تا ۳۰ روز انجام گرفت که نتایج این مطالعه کاهشی در وزن بیضه نشان نداد (Tan et al., ۲۰۰۳). Fialkowski نشان داد که گاهی در دوزهای پایینتر BPA اثرات بیشتری از دوزهای بالاتر مشاهده می‌شود. برای مثال در ۷۰ روز بعد از تولد، وزن بیضه‌ها در موش‌های نری که مادرانشان دوز $100 \mu\text{g/kg/day}$ گرفته بودند، کاهش یافت، اما این اثر در دوزهای بالاتر از $50,000 \mu\text{g/kg/day}$ دیده نشد. Motohara نشان داد که BPA در دوزهای پایین‌تر براسپرماتوژنز رت‌های بالغ تاثیر می‌گذارد. او به رت‌های نر با سن ۱۳ هفته، یک دوز روزانه از $2 \mu\text{g/kg/day}$ تا $200 \mu\text{g/kg/day}$ را به مدت ۶ روز داد و وزن بیضه و تولید اسپرم روزانه را طی هفته‌های ۱۴ و ۱۸ بررسی کرد. BPA با دوز $20 \mu\text{g/kg/day}$ منجر به کاهش وزن بیضه و کاهش تولید اسپرم روزانه شد. Takahashi و همکاران به رت‌های بالغ دوز بالای BPA $235-950 \mu\text{g/kg/day}$ به مدت ۴۴ روز داد و در بررسی خود کاهش وزن بیضه‌ها را گزارش داد (Takahashi et al., ۲۰۰۱). در مطالعات دیده شده که از دست رفتن وزن گناد وابسته به تغییرات وزن بدن رت است و کاهش وزن بیضه همراه با کاهش وزن کلی بدن است (Kianifard et al., ۱۹۹۹). همانطور که نتایج ما نیز کاهشی را در وزن بدن و در نتیجه وزن بیضه رت‌های تیماری با BPA نشان نداد. یک علت برای کاهش وزن در بیضه می‌تواند در اثر کاهش جذب غذا باشد (Rehm et al., ۲۰۰۸; Faucher et al., ۲۰۰۸; De jager et al., ۱۹۹۹b) و چون همه گروه‌ها در مطالعه ما دارای رژیم غذایی مشابه و

جذب غذایی مشابهی بودند بنابراین کمبود تغذیه وجود نداشته تا منجر به کاهش وزن بیضه شده باشد. همچنین کاهش FSH هیپوفیزی نیز به عنوان دلیل دیگری در کاهش وزن بیضه ذکر شده است بیانگر اهمیت هیپوفیز در حفظ وزن بیضه است (Latif et al., ۲۰۰۸). مطالعات پیشین نشان می دهد که BPA می تواند منجر به کاهش معنی دار سطح تستوسترون در رت های بالغ در دوز $50 \mu\text{g/kg/day}$ شود (Saito et al., ۲۰۰۳; Salian et al., ۲۰۰۹). کاهش تستوسترون خود می تواند به طور مستقیم بر تولید Inhibin سلول های سرتولی اثر بگذارد و یا ممکن است با اختلال در اسپرماتوژنز بر تنظیم پاراکرین Inhibin توسط سلول های جنسی اثر بگذارد که در نهایت منجر به کاهش Inhibin، و افزایش سطح FSH می شود (Latif et al., ۲۰۰۸). از آنجائیکه تستوسترون و Inhibin هر دو اثر مهاری بر ترشح FSH از هیپوفیز قدامی دارند. با از بین رفتن این مهار می توان انتظار داشت که سطح FSH افزایش یابد (گایتون و هال، ۱۳۸۶). با توجه به مطالعات Salian و همکارانش در سال ۲۰۰۹ سطح FSH در گروه های تیمار شده با $400 \mu\text{g/kg bw}$ و $1600 \mu\text{g/kg bw}$ از BPA نسبت به گروه شاهد افزایش نشان داد. بنابراین با توجه به عملکرد این هورمون در حفظ وزن بیضه، این عامل می تواند به عنوان دلیل دیگری برای کاهش نیافتن وزن بیضه در گروه رت های تیمار شده با BPA استفاده شود (Salian et al., ۲۰۰۹).

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

در این مطالعه میانگین حجم کل بیضه در بین گروه های مختلف تیمار و کنترل تغییرات معنی داری را نشان نداد ($P < 0.05$). Sharpe و همکارانش در سال ۱۹۹۶ کاهش اندازه بیضه جنین های حاصل از رت های حامله ای که یک دوز $1 \text{ mg/l} = 1 \text{ ppm}$ از BPA در آب خوردن گرفته بودند را گزارش داد (Sharpe et al., ۱۹۹۶). این مقدار برابر $370-123 \mu\text{g/kg/day}$ می باشد. اما Cagen و همکارانش که مطالعه Sharpe را تکرار کردند این اثرات را پیدا نکردند (Cagen et al., ۱۹۹۹). چنانچه دیده شد در مطالعه ما میانگین حجم لوله های منی ساز (mm^3) در گروه بیس فنل آ نسبت به سایر گروه ها کاهش معنی داری ($P < 0.02$) داشت. در مطالعات دیگر نیز آتروفی لوله های منی ساز در اثر BPA مشاهده شده است به عنوان مثال در مطالعه ای که Takahashi و Oishi در سال ۲۰۰۱ بر روی رت های بالغی که با دوز 235 mg/kg/day از BPA به مدت ۴۴ روز تحت تیمار قرار گرفتند، انجام دادند؛ آتروفی لوله های منی ساز را در رت های تیماری با BPA گزارش کردند (Takahashi et al., ۲۰۰۱). همچنین کاهش قطر لوله های منی ساز در موش های Kunming پس از گذشت ۴۵ روز تیمار با BPA در دوز 480 mg/kg/day توسط Li و همکارانش در سال ۲۰۰۹ گزارش شده است (Li et al., ۲۰۰۹). محققان آتروفی لوله های منی ساز را ناشی از کاهش سلول های جنسی و میزان زیاد آپوپتوز سلول های جنسی می دانند (Canegum et al., ۲۰۰۹). آپوپتوز سلول های جنسی و کاهش تعداد این سلول ها توسط BPA در تحقیقات مختلف گزارش شده است (Li YJ et al., ۲۰۰۹; Print and Loveland, ۲۰۰۰; Rodriguez et al., ۱۹۹۷; Russell et al., ۲۰۰۲). نتایج مطالعه ما نیز کاهش معنی دار تعداد سلول ها را در دودمان سلول های جنسی در رت های تیمار شده با BPA نشان داد که بنابراین می تواند به عنوان دلیلی در کاهش حجم لوله های منی ساز استفاده شود.

در مطالعه ما میانگین حجم بافت بینابینی (mm^3) گروه BPA نسبت به سایر گروه ها افزایش معنی داری ($P < 0.001$) نشان داد. چنانچه از نتایج مطالعه حاضر بر می آید ویتامین C توانسته است اثر BPA بر کاهش حجم لوله های منی ساز و افزایش حجم بافت بینابینی را جبران نماید. ویتامین C به عنوان یک آنتی اکسیدان اصلی در بیضه مطرح شده است (Augustine et al., ۲۰۰۵) و خنثی کننده ROS است و مانع از لخته شدن اسپرم می شود (Aitken ۱۹۹۹; Dawson et al., ۱۹۹۲). ویتامین C یک دهنده الکترون برای سیستم ردوکس است و مانع از پراکسیداسیون لیپیدها می شود و نیز موجب بازیافت ویتامین E و حفاظت DNA از آسیب های ناشی از رادیکال های هیدروژن پراکسید می گردد (Jedliska-Krakovska et al., ۲۰۰۶). ویتامین C به میزان زیادی بیضه را در برابر آسیب های تحریک شده توسط سیس پلاتین محافظت می کند

(Naryanana et al., ۲۰۰۹). رژیم های غذایی حاوی ویتامین C یک نقش حساس در حفاظت از سلول های جنسی نر بر ضد آسیب های اکسیداتیو دارد. کمبود ویتامین C موجب دژنره شدن های وسیع در اپی تلیوم لوله منی ساز و پوسته شدن آن به درون لومن این لوله ها در بیضه خوکچه هندی می شود (Sapra, Lindsay & Medes, ۱۹۲۶) و همکارانش در سال ۱۹۸۷ مشاهده کردند که کمبود ویتامین C در خوکچه هندی موجب کاهش وزن برخی اندام های تولید مثلی می شود (Sapra et al., ۱۹۸۷). مطالعات دیگر نشان داد که وزن بیضه و اندام های ضمیمه جنسی با برخی مواد سمی به طور معنی داری کاهش می یابد و ویتامین C باعث برگشت این کاهش می شود (Das et al., ۲۰۰۲; EL-Missiry, ۱۹۹۹). بنابراین با توجه به مطالب ذکر شده در مورد اثرات حفاظتی ویتامین C بر بافت بیضه، دور از انتظار نیست که این ویتامین موجب بهبود پارامترهای فوق الذکر در مطالعه ما شده باشد.

قطر، ارتفاع اپیتلیوم زایشی، طول و ضخامت غشاء پایه لوله های منی ساز

در تحقیقات مختلفی که بر روی اثر مواد شیمیایی سمی بر روی بافت بیضه صورت گرفته، پارامترهایی مثل قطر لوله های منی ساز و ضخامت اپیتلیوم زایشی به عنوان پارامترهای حساس نسبت به سمیت بیضوی شناخته شده اند (Larsen et al., ۱۹۹۹b; De Jager et al., ۱۹۹۷; Simorangkir et al., ۱۹۹۱). چنانچه در این مطالعه دیده شد، میانگین قطر و ارتفاع اپیتلیوم زایشی لوله های منی ساز و ضخامت غشاء پایه لوله های منی ساز در گروه بیس فنل آ نسبت به سایر گروه ها به طور معنی داری ($P < 0.008$) کاهش یافت. Tyl و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۷ طی بررسی خود موش های CD-1 را با دوزهای ۳، ۶۰۰ mg/kg/day از BPA به مدت ۲۱ روز تحت تیمار قرار دادند که نتایج بیانگر هیپوپلازی (رشد ناکامل) لوله های منی ساز در دوز ۶۰۰ mg/kg/day نسبت به گروه کنترل بود. همچنین در مطالعه Atsushi و همکارانش در سال ۲۰۰۸ بر روی موش های ICR والد که با دوزهای ۱۰۰ μg/kg/day و ۵ mg/kg/day از BPA تیمار شدند، کاهش قطر لوله های منی ساز در نوزادان نر آنها دیده شد (Atsushi et al., ۲۰۰۸). در مطالعه دیگری که بر روی رت های نر نژاد ویستار با دوزهای ۲۰۰ mg/kg/day از BPA در رت های ۲۸ روزه انجام گرفت، پس از ۳۰ روز تیمار، تغییرات در هیستولوژی بیضه ها بررسی شد، که بیانگر دژنره شدن اپیتلیوم زایشی لوله های منی ساز و کاهش تولید اسپرم بود (Takahashi and Oishi, ۲۰۰۳). در تحقیقی که توسط Anahara و همکارانش در سال ۲۰۰۶ بر روی موش های ICR با دوز ۲/۴ μg/kg-day به مدت ۵ روز از طریق تزریق داخل صفاقی صورت گرفت کاهش سطح پروتئین cortactin در بیضه دیده شد، که نشان دهنده تغییرات در ساختار تخصصی اکتوپلاسمی آپیکالی در اپیتلیوم اسپرم ساز می باشد (Anahara et al., ۲۰۰۶). Takahashi و همکارانش در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که BPA در دوز بالا موجب دژنره شدن اپیتلیوم زایشی لوله های اسپرم ساز و کاهش اسپرم های دراز می شود (Takahashi et al., ۲۰۰۶). تیمار موش های نر CD-1 با سن ۲۸ روز به روش گاواژ دهانی با دوز ۴۸۰ mg/kg/day، ۱۶۰ از بیس فنل آ باعث کاهش قطر لایه سلول های اسپرماتوزنر و اختلال در اسپرماتوزنر شد (Qun Wang et al., ۲۰۰۹). بررسی بافت شناسی بیضه موش بالغ که از بدو تولد با دوزهای ۴۰۰ g/bw/day و ۱۶۰۰ μg/bw/day از بیس فنل آ تحت تیمار قرار گرفتند، ریزش سلول های زایای لوله های اسپرم ساز را به لومن نشان داد و این موضوع بیانگر کاهش قطر و ضخامت اپیتلیوم زایشی است (Smita et al., ۲۰۰۷). معمولاً بین قطر لوله های منی ساز و فعالیت اسپرماتوژنیک بیضه رابطه مثبتی وجود دارد (de Souza Predes et al., ۲۰۰۹; Sinha-Hikim et al., ۱۹۸۹; Franca and Russell, ۱۹۹۸). کاهش قطر لوله های منی ساز ممکن است نشان دهنده کاهش تعداد سلول های سرتولی و یا تخریب اسپرماتوزنر باشد (Kovacevic et al., ۲۰۰۶). در مطالعه ما نیز کاهش قطر لوله های منی ساز در رت های تیمار شده با BPA با کاهش معنی دار سلول های جنسی و سرتولی همراه بود. کاهش ارتفاع اپیتلیوم زایشی در رت های گروه BPA نیز نشان دهنده کاهش تعداد سلول های جنسی در اپیتلیوم زایشی و آزاد سازی زود هنگام اسپرماتیدهای نابالغ به لومن است. BPA با آسیب زدن به ارتباطات بین سلول های سرتولی در مناطق (Ectoplasmic ES Specialization) منجر به بی ثبات سازی سد خونی-بیضه ای (Blood-Testis Barrier) و در نهایت باعث از دست رفتن

اسپرماتوسیت ها، اسپرماتیدها و آزادسازی زود هنگام اسپرماتوزوآ به درون لومن می شود (Toyama and Yuasa, ۲۰۰۴; Anahara et al., ۲۰۰۶). بنابراین احتمال دارد BPA از این طریق موجب کاهش ارتفاع اپیتلیوم زایشی شده باشد.

همچنین با توجه به اثر استرس اکسیداتیوی BPA (Jain et al., ۲۰۱۱; Ohta et al., ۲۰۱۱) کاهش در تعداد لایه های اپیتلیوم منی ساز می تواند در نتیجه توقف اسپرماتوگونیوم B در تقسیمات میتوزی نیز باشد که این به معنی طول شدن فاز G^۱ در این سلول ها است. طولانی شدن فاز G^۱ در نتیجه ممانعت از سنتز سیکلین ۱ به خاطر بیان بیش از اندازه ژن XBP^۱ می باشد. پروموتور این ژن دارای چندین عامل تنظیم شونده با استرس است که یکی از آن ها به استرس اکسیداتیو پاسخ می دهد (Mai et al., ۱۹۹۷; Jedlinska-ktakowska et al., ۲۰۰۶).

میانگین طول لوله های منی ساز در این بررسی، در بین چهار گروه تفاوت معنی داری نداشت ($P > 0.05$). طول لوله های منی ساز به سه پارامتر ساختاری بیضه وابسته است: ۱) اندازه بیضه (۲) قطر لوله های منی ساز (۳) دانسیته حجمی لوله های منی ساز (Franca and Russell., ۱۹۹۸). که در مطالعه ما در پارامتر اول موثر بر اندازه طول لوله ها، یعنی وزن بیضه رت های تیماری با BPA تغییری مشاهده نشد، اما قطر و دانسیته حجمی لوله های منی ساز کاهش نشان داد. بنابراین ممکن است به دلیل تغییر نکردن وزن بیضه، طول لوله ها نیز کاهش معنی داری نشان نداده باشد.

میانگین ضخامت غشاء پایه لوله های منی ساز در گروه بیس فنل آ نسبت به سایر گروه ها کاهش معنی داری ($P < 0.008$) نشان داد. با توجه به اینکه غشاء پایه نیز از جنس پروتئین می باشد (Paulsson., ۱۹۹۲)، این احتمال وجود دارد که بیس فنل آ با تاثیر بر روی پروتئین های غشاء پایه باعث کاهش ضخامت آن شده باشد.

BPA موجب افزایش سطح رادیکال های آزاد (ROS) و لیپید پراکسیداسیون و کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در بافت بیضه می شود (K.C Chitra et al., ۲۰۰۳). بافت بیضه به دلیل محتوای بالای اسیدهای چرب غیر اشباع در غشاء سلول هایش و درجه بالای متابولیسم و تکثیر سلولی در این بافت، به استرس اکسیداتیو بسیار حساس می باشد که این مساله نشان دهنده پراهمیت بودن ظرفیت آنتی اکسیدانی بافت بیضه است (Elshaari et al., ۲۰۱۰). بنابراین اثرات مشاهده شده در این مطالعه را می توان تا حدی ناشی از اثرات استرس اکسیداتیوی BPA دانست. همانطور که Celik و Suzek نیز گزارش کردند که کاهش در سطح GSH و آنزیم های متابولیز کننده آن نقص اصلی را در برابر آسیب سلولی القاء شده با ROS ایجاد می کند (Celik and Suzek., ۲۰۰۸). که در نتیجه ی کمبود GSH، تعدادی از عملکردهای مرتبط با آن ممکن است آسیب ببیند مثل کاهش در ظرفیت احیاء، بیوسنتز پروتئین، عملکرد ایمنی، انباشتگی محصولات لیپید پراکسیداسیون و ظرفیت دفع سموم (Karafakioglu and Aslan., ۲۰۱۰). که این اختلالات ایجاد شده در اثر BPA می تواند آسیب هایی را بر بافت بیضه ایجاد کند.

چنانچه دیده شد، ویتامین C در گروه بیس فنل آ + ویتامین C، توانست اثرات BPA را در پارامترهای فوق تا حدود بسیار زیادی خنثی و آن را در حد گروه کنترل حفظ کند. همچنین ویتامین C در گروه بیس فنل آ + ویتامین C، توانست اثرات BPA بر ضخامت غشای پایه را تا حدود بسیار زیادی خنثی و آن را در حد گروه کنترل حفظ کند که احتمالاً به علت نقش این ویتامین در سنتز اجزای ماتریکس خارج سلولی، بویژه هیدروکسیلاسیون کلاژن باشد (Duarte et al., ۲۰۰۵; Li et al., ۱۹۸۴; Faris B et al., ۲۰۰۷). زیرا کلاژن IV یکی از اجزای اصلی غشای پایه محسوب می شود (Paulsson, ۱۹۹۳).

در مطالعه ای که توسط Sönmez و همکارانش در سال ۲۰۰۵ بر روی رت های نر و بیستار بالغ انجام گرفت؛ رت ها با دوزهای ۵۰۰، ۲۵۰ mg/kg/day ویتامین C به مدت ۶ هفته تیمار شدند و کاهش معنی دار در سطح پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش معنی دار در غلظت اسپرم های اپیدیدیم و سطح تستوسترون پلازما در بین گروه های تیماری مشاهده شد (Sönmez et al., ۲۰۰۵).

بنابراین چنانچه در بالا گفته شد میتوان بیشتر اثرات بیس فل آ را بر بافت بیضه به خاصیت استرس اکسیداتیوی آن نسبت داد که ویتامین C نیز با خاصیت آنتی اکسیدانی خود توانسته این اثرات را بهبود بخشد.

تعداد سلول های اسپرماتوگونی (نوع A و B)، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سرتولی

در این مطالعه کاهش معنی داری در تعداد سلول های اسپرماتوسیت ($P<0/02$)، اسپرماتید ($P<0/001$) و سرتولی ($P<0/05$) در گروه BPA نسبت به سایر گروه ها مشاهده شد. تنها در تعداد اسپرماتوگونی نوع A و B این تغییر مشاهده نشد، این سلول ها تنها کاهش معنی داری ($P<0/02$) نسبت به گروه ویتامین C نشان دادند. عدم تغییر در تعداد سلول های اسپرماتوگونی در این بررسی بیان می کند که اسپرماتوگونی نسبت به سمیت BPA مقاومت بیشتری داشته است، که این مشاهده با گزارش Aydos et al., ۲۰۰۱ سازگاری دارد که اسپرماتوگونی مقاوم ترین سلول جنسی در لوله های منی ساز است. Hanadi و همکارانش نیز گزارش کردند که سلول های جنسی رت بالغ در مراحل ابتدایی تر اسپرماتوژنز (اسپرماتوگونی) کمتر تحت تاثیر سمیت استرس اکسیداتیوی نسبت به مراحل بعدی (اسپرماتوسیت و اسپرماتید) قرار می گیرد (Hanadi et al., ۲۰۱۱). D'Cruz, et al., ۲۰۱۱ و همکاران در سال ۲۰۱۱ از مشاهدات خود نتیجه گرفتند که BPA می تواند به طور مستقیم با ارتباط برقرار کردن با گلوکز ترانسپورتر-۲ و گلوکز ترانسپورتر-۸ باعث اختلال در حمل و نقل گلوکز به درون سلول های بیضه شود. آنها گزارش کردند که قرار گرفتن در معرض مداوم BPA در دوزهای کم باعث اختلال در مکانیزم انسولین سیگنالینگ، هموستاز گلوکز و استروئیدوژنز در بیضه شود. BPA می تواند با اتصال به منفذ پروتئین های GLUT این منافذ را مسدود کرده و از حرکت گلوکز جلوگیری نمایند و در فرایند اسپرماتوژنز اختلال ایجاد نماید (D'Cruz et al., ۲۰۱۱). در لوله های اسپرم ساز، آپوپتوز یکی از ویژگی های طبیعی دودمان اسپرماتوژنز و هموستاز بیضه است. در طول مراحل مختلف اسپرماتوژنز پستانداران، آپوپتوز سلول های جنسی برای حذف سلول های غیر طبیعی اسپرماتوژنز رخ می دهد (Print and Loveland, ۲۰۰۰; Rodriguez et al., ۱۹۹۷; Russell et al., ۲۰۰۲). فقدان هورمون، حرارت و در معرض تابش قرار گرفتن، باعث تشدید آپوپتوز سلول های زایا در بیضه ها می شود (Vera et al., ۲۰۰۲). Hikim et al., ۲۰۰۳; Embree-Ku et al., ۲۰۰۲; al., ۲۰۰۶ سلول های رده سرتولی، سلول های سوماتیکی هستند که از پایه تا رأس اپیتلیوم منی ساز گسترش یافته اند و به طور مستقیم با سلول های جنسی در سراسر روند اسپرماتوژنز برهمکنش دارند و به عنوان سلول های پرستار، به اصطلاح با حمایت ساختاری و حمایت های متابولیک در توسعه سلول های جنسی نقش دارند. از آنجا که بسیاری از عوامل ضروری برای توسعه سلول های جنسی توسط سلول های سوماتیک رده سرتولی سنتز شده (Griswold MD, ۱۹۹۵; Meehan et al., ۲۰۰۰)، و از آنجا که فقط تعدادی از اسپرم های تولید شده در هر روز، توسط تعدادی از سلول های رده سرتولی در لوله های منی ساز سازماندهی و حمایت می شود (Amann RP ۱۹۷۰)، بنابراین هر عاملی که باعث اختلال در زنده ماندن و عملکرد سلول های رده سرتولی شود ممکن است بیشترین اثر را بر اسپرماتوژنز بگذارد.

تحقیقات نشان می دهد که قرار گرفتن در معرض $200-150 \mu\text{m}$ بیس فل آ باعث کاهش قابلیت حیات سلول های رده سرتولی در محیط کشت، با القا آپوپتوز، می شود (Hiroshi et al., ۲۰۰۳). نتایج نشان می دهد که مرگ سلول های رده سرتولی تیمار شده با BPA به علت نکروز نیست و عاملش فعال شدن مسیر سیگنال دهی آپوپتوز در سلول های سرتولی است (Hiroshi et al., ۲۰۰۳). برخی مطالعات دیگر نیز در محیط *in vitro* نشان داده که BPA موجب آپوپتوز سلول های سرتولی می شود (Hughes et al., ۲۰۰۰; Iida et al., ۲۰۰۳). BPA موجب افزایش سطح caspase-3 ، FasL و Fas در سلول های بینابینی و جرم سل ها شده و با فعال کردن مسیر سیگنال دهی FAS باعث شروع آپوپتوز سلول های لیدیگ و سپس باعث آپوپتوز جرم سل ها می شود. (Li et al., ۲۰۰۹). در این مکانیسم، FasL از سلول های سرتولی ترشح می شود، که رسپتور آن یعنی Fas بر روی غشاء سلول های جنسی وجود دارد. اتصال Fas و FasL مسیر داخل سلولی "death domain" را آغاز می کند که سرانجام منجر به تجزیه DNA از طریق آبشار کاسپازی و در نهایت مرگ سلولی می شود.

(Elshaari et al., ۲۰۱۰). همچنین در مطالعات زیادی مشخص شده که استرس اکسیداتیو و آزاد سازی ROS نیز طی اسپرماتوژنز در آپوپتوز سلول های جنسی در بیضه نقش دارد (Mathur et al., ۲۰۱۱).

در بررسی نیز که توسط K.C Chitra و همکارانش بر روی اثر استرس اکسیداتیوی BPA بر بافت بیضه رت های بالغ انجام گرفت، BPA در دوزهای $20 \mu\text{g/Kg/ bw/day}$ و ۲ به مدت ۴۵ روز موجب کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز شد در حالی که سطوح H_2O_2 و پراکسیداسیون لیپیدی به طور قابل توجهی در رت های تیمار شده، در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. بنابراین نتایج نشان داد که دوزهای بیس فنل آ موجب کاهش سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و باعث القاء استرس اکسیداتیو در رت می شود (K.C Chitra et al., ۲۰۰۳). BPA می تواند عملکرد سد خونی-بیضه ای (BTB) را در موش های نابالغ مختل سازد (Li et al., ۲۰۰۹d) که مشخص شده این امر می تواند با تاثیر بر سلول های جنسی و یا کاهش تولید پروتئین های موثر در مهاجرت سلول های درون اپیتلیوم زایشی، مانع از باروری موشها شود (Fiorini et al., ۲۰۰۴; Li et al., ۲۰۰۹d).

به دلیل خاصیت استروژنی BPA، این ماده می تواند باعث تنظیم منفی آنزیم های دخیل در بیوسنتز استروژن در سطح بیان ژن شود. در بیوسنتز استروژنها، $\text{P}450$ آروماتاز (19CYP) یک آنزیم محدود کننده سرعت سنتز استروژنهاست. بیان 19CYP توسط چند عامل خارجی تحت تاثیر قرار می گیرد. به تازگی، Huang و Leung گزارش داده اند که BPA باعث کاهش بیان 19CYP رده سلول های جفت انسان می شود (Huang and Leung., ۲۰۰۹) و این کاهش هم در فعالیت 19CYP و هم در رونویسی ژن 19CYP ، در پاسخ به BPA دیده می شود (Huang and Leung., ۲۰۰۹). همچنین تیمار رت های نژاد ویستار با دوز ۱ میلی گرم BPA به مدت ۲ هفته موجب کاهش غلظت تستوسترون پلازما و بیضه شده است (Atsushi Tohei et al., ۲۰۰۰). تستوسترون، یک هورمون جنسی نر است که از سلول های لیدیگ ترشح می شود و تحت کنترل هورمون تولید کننده ی جسم زرد (LH) می باشد که از غده هیپوفیز پیشین آزاد می شود. این ماده برای تکوین فنوتیپ نر و ایجاد رفتار جنسی در دیگر بافتها، لازم و ضروری است (Rahman & Christian ۲۰۰۷). برای مثال، تمایز سلول های اسپرماتید و طویل شدن اسپرماتید ها در مراحل هفت و هشت، نیازمند فعالیت تستوسترون می باشد (Sun et al., ۱۹۹۴; McLachlan et al., ۱۹۹۰). بر اساس مطالعات صورت گرفته، تستوسترون می تواند بر تکامل سلول های زاینده بویژه روند تکاملی اسپرماتید های کروی تقسیم یافته تأثیر گذاشته و آن را کنترل کند (Sun et al., ۱۹۹۴; McLachlan et al., ۱۹۹۰). به عنوان مثال، ممانعت از ترشح تستوسترون درون بیضه ای از طریق پیوند تستوسترون-استرادیول می تواند مانع از تغییر سلول های کروی تقسیم یافته به صورت سلول های توسعه یافته بویژه در مراحل هفت و هشت شود (O'Donnell et al., ۱۹۹۴). مطالعات بعدی تأکید می کند که عدم وجود اسپرماتید های طویل شده در موشهایی که از ترشح تستوسترون در آنها جلوگیری شده، در نتیجه این واقعیت است که سلول های کروی تقسیم یافته، پیش از موعد مقرر از اپیتلیوم جدا می شوند (O'Donnell et al., ۱۹۹۶). لذا می توان چنین نتیجه گرفت که تستوسترون یک عامل اصلی و مهم در تنظیم دینامیک پیوندها در بیضه است. واضح است که تستوسترون نه تنها در اتصال سلول های کروی - سلول های سرتولی در ES (Ectoplasmic Specializations) موثر است بلکه می تواند به عنوان یک تنظیم کننده ی مثبت عمل کرده تا انسجام و پیوستگی سد خونی-بیضه ای حفظ شود (O'Donnell et al., ۲۰۰۳; Lui et al., ۱۹۹۶).

در کل با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و نتایج دیگران می توان کاهش سلول های اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سرتولی را به چند دلیل مربوط دانست. ۱) بهم خوردن تعادل هورمون های جنسی ۲) از آنجائیکه سلول های جنسی در یک محیط تولید شده توسط سلول های سرتولی زندگی می کنند (Boekelheide et al., ۲۰۰۰)، لذا با از بین رفتن سلول های سرتولی شرایط مناسب برای زندگی سلول های جنسی نیز از بین می رود. ۳) افزایش آپوپتوزیس و ۴) القاء استرس اکسیداتیو. در این مطالعه در

گروه‌هایی که همزمان با بیس‌فنل‌آ، ویتامین C دریافت می‌کردند کاهش در تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سرتولی به طور معنی‌داری جبران شد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج ما کاهش در حجم لوله‌های منی‌ساز، افزایش در حجم بافت بینابینی، کاهش قطر، ارتفاع اپیتلیوم زایشی و ضخامت غشاء پایه لوله‌های منی‌ساز همچنین کاهش در تعداد سلول‌های سرتولی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید را در رت‌های تیماری با BPA نشان داد و ویتامین C در گروه بیس‌فنل‌آ + ویتامین C باعث افزایش معنی‌دار پارامترهای مذکور به حد گروه کنترل شد. نتایج این تحقیق نشان داد که بیس‌فنل‌آ (BPA) تأثیرات منفی قابل توجهی بر ساختار و عملکرد بیضه در رت‌های نر نژاد ویستار داشته است. با توجه به این که بیس‌فنل‌آ به‌عنوان یک آلاینده زیست‌محیطی شناخته می‌شود، می‌توان انتظار داشت که قرار گرفتن در معرض آن، تأثیرات زیان‌بار زیادی بر سیستم‌های فیزیولوژیک بدن موجودات زنده بگذارد. در این مطالعه، مهم‌ترین تأثیرات BPA بر کاهش حجم لوله‌های منی‌ساز، افزایش حجم بافت بینابینی، کاهش قطر لوله‌های منی‌ساز، کاهش ارتفاع اپیتلیوم زایشی و ضخامت غشاء پایه لوله‌های منی‌ساز، همچنین کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سلول‌های سرتولی در بیضه‌ها مشاهده شد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که BPA ممکن است با ایجاد استرس اکسیداتیو و اختلالات هورمونی، موجب آسیب به ساختار بافت بیضه و اختلال در فرآیند اسپرماتوژنز شود. بیس‌فنل‌آ به‌طور عمده از طریق افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو به بافت‌ها آسیب می‌زند. در این تحقیق، نتایج به‌طور مشخص نشان داد که دوزهای BPA باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در بافت بیضه می‌شود. این تغییرات شیمیایی به نوبه خود موجب افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب غشاهای سلولی می‌گردد. این یافته‌ها با تحقیقات پیشین هم‌خوانی دارد که نشان می‌دهند BPA می‌تواند باعث اختلال در فعالیت‌های سلولی و آسیب به بافت‌های حساس مانند بیضه‌ها شود. با توجه به اینکه غشاء سلول‌های بیضه غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع است، به‌طور طبیعی حساسیت بیشتری نسبت به آسیب‌های اکسیداتیو دارد. به همین دلیل است که این بافت‌ها بیشتر در معرض آسیب‌های ناشی از BPA قرار می‌گیرند.

در این مطالعه، ویتامین C به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی بررسی شد و نتایج نشان داد که ویتامین C می‌تواند تأثیرات منفی بیس‌فنل‌آ بر ساختار بیضه را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد. گروه‌های تیمار شده با ویتامین C، که در کنار BPA دریافت کرده بودند، توانستند پارامترهایی مانند حجم لوله‌های منی‌ساز، ضخامت غشاء پایه، قطر لوله‌های منی‌ساز و تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سلول‌های سرتولی را تا حد زیادی به سطح گروه کنترل بازگردانند. این نتایج نشان‌دهنده اثرات حفاظتی ویتامین C در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از BPA است.

ویتامین C با خواص آنتی‌اکسیدانی خود می‌تواند رادیکال‌های آزاد ایجاد شده در اثر BPA را خنثی کرده و از آسیب به سلول‌ها جلوگیری کند. مطالعات پیشین نیز نشان داده‌اند که ویتامین C می‌تواند اثرات منفی بسیاری از سموم و آلاینده‌ها را کاهش دهد. به‌عنوان مثال، در تحقیقی که توسط Stojiljkovic و همکاران (۲۰۱۰) بر روی اثرات سمیت جنتامایسین انجام شد، مشخص گردید که ویتامین C با کاهش رادیکال‌های آزاد، سمیت کلیوی ناشی از جنتامایسین را کاهش می‌دهد. به همین ترتیب، ویتامین C در این تحقیق به‌طور مؤثر از آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از BPA بر بافت بیضه جلوگیری کرد.

ویتامین C به‌عنوان یک دهنده الکترون، در سیستم‌های ردوکس بدن نقش حیاتی ایفا می‌کند و می‌تواند از پراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری کند. این ویتامین همچنین باعث بازسازی ویتامین E می‌شود که از آن به‌عنوان یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های بدن یاد می‌شود. علاوه بر این، ویتامین C می‌تواند به حفاظت از DNA در برابر آسیب‌های اکسیداتیو کمک کند، که این ویژگی برای حفظ سلامت سلول‌های بیضه و فرآیند اسپرماتوژنز بسیار مهم است. به‌طور کلی، ویتامین C به‌عنوان یک عامل ضد استرس اکسیداتیو، می‌تواند اثرات مخرب BPA را کاهش دهد و به بهبود ساختار بافت بیضه کمک کند. در این مطالعه، گروه‌های مختلف تیمار و کنترل با یکدیگر مقایسه شدند و نتایج نشان داد که گروه‌هایی که تحت تیمار ترکیبی BPA

و ویتامین C قرار گرفتند، نسبت به گروه های تنها تیمار شده با BPA، به طور معنی داری وضعیت بهتری داشتند. این یافته ها تأکید می کنند که مصرف ویتامین C به عنوان یک مکمل غذایی می تواند به طور مؤثری اثرات نامطلوب BPA را در بیضه ها کاهش دهد. از سوی دیگر، گروه کنترل که هیچ گونه تیماری دریافت نکرده بود، وضعیت طبیعی بیضه ها را نشان داد که به عنوان یک شاخص برای مقایسه با سایر گروه ها در نظر گرفته شد.

منابع

- Cheng C and Mruk D (۲۰۱۰). The biology of spermatogenesis: The past, present and future. *Phil Trans R Soc Lond B* ۳۶۵:۱۴۵۹-۱۴۶۳.
- Chitra, KC, C Latchoumycandane and PP Mathur. ۲۰۰۳. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology* ۱۸۵:۱۱۹-۱۲۷.
- Claire L Borg, Katja M Wolski, Gerard M Gibbs, Moira K O'Bryan. Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'non-performer'. *Hum. Reprod. Update* ۱۶(۲):۲۰۵-۲۴. PMID:۱۹۷۵۸۹۷۹ | PMC۲۸۱۶۱۹۱ | Hum Reprod Update.
- Clark, E., Brugge, J. (۱۹۹۵). Integrins and signal transduction pathways: the road cekk, ۶۹, ۱۱-۲۵.
- Crain, D. A., M. Eriksen, T. Iguchi, S. Jobling, H. Laufer, G. A. LeBlanc and L. J. Guillette, Jr. (۲۰۰۷). "An ecological assessment of bisphenol-A: evidence from comparative biology." *Reproductive Toxicology* (Elmsford, N.Y.) ۲۴(۲): ۲۲۵-۳۹.
- Creasy DM, ۱۹۹۷. Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicol Pathol.* ۲۵(۲):۱۱۹-۳۱.
- D Kretser D., Kerr J. ۱۹۸۸. The cytology of the testis. In *The physiology of reproduction* (eds Knobil E., Neill J., Ewing L., Greenwald G., Markert C., Pfaff D., editors.). New York, NY: Raven Press.
- D. Roy, M. Palangat, C.W. Chen, R.D. Thomas, J. Colerangle, A. Atkinson, Z.J. Yan, J. Toxicol. Environ. Health ۵۰ (۱۹۹۷) ۱-۲۹.
- D' cruz, s. C. – jubendradass, r. – jaykathan, m. – rani, s.j.a. –mathur, P.P. ۲۰۱۱. Bisphenol A impairs insulin signalling and glucose homeostasis and decreases steroidogenesis in rat testis: An in vivo and in silico study. In *Food and Chemical Toxicology*, DOI.۱۰.۱۰۱۶/j.fct. ۲۰۱۱, ۱, ۱, ۰۴۱. ۲۰۱۱.
- da M, Kachru DN, Tandon SK. Influence of thiamine and ascorbic acid supplementation on the antidotal efficacy of thiol chelators in experimental lead intoxication. *Arch Toxicol*, ۱۹۸۸ ; ۶۲(۴): ۳۰۱-۴.
- Daichi N, Yukie Y. (۲۰۱۰). Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. *Toxicology Letters*, Volume ۱۹۴, Issues ۱-۲, ۱۵ April ۲۰۱۰, Pages ۱۶-۲۵.
- Dalgaard M, Pilegaard K, Ladefoged O. In utero exposure to diethylstilboestrol or ۴-n-nonylphenol in rats: number of Sertoli cells, diameter and length of seminiferous tubules estimated by stereological methods. *Pharmacol Toxicol* ۲۰۰۲; ۹۰: ۵۹-۶۵.
- Dalley JW, Gupta PK, Hung CT. A physiological pharmacokinetic model describing the disposition of lead in the absence and presence of L-ascorbic acid in rats. *Toxicol Lett.* ۱۹۹۰ ; ۵۰(۲-۳): ۳۳۷-۴۸.

Das Ub, Mallick M, Debnath Jm, Ghosh D (۲۰۰۲) Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide- induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. Asian J Androl ۴: ۷-۲۰.

Das Ub, Mallick M, Debnath Jm, Ghosh D (۲۰۰۲). Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide-induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. Asian J Androl ۴: ۷-۲۰.

Dawson, E.B., Harris, W.A., Teter, M.C. and Powell, L.C. (۱۹۹۲) Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. Fertil. Steril., ۵۸, ۱۰۳۴-۱۰۳۹.

Dawson, EB; Harris, WA and Powell, LC (۱۹۹۰). Relationship between ascorbic acid and male fertility. World Rev. Nutr. Diet., ۶۲: ۱-۲۶.

De Jager C, Bornman MS, van der Horst G. The effect of p-nonylphenol, an environmental toxicant with oestrogenic properties, on fertility potential in adult male rats. Andrologia ۱۹۹۹; ۳۱: ۹۹-۱۰۶.

de Souza Predes F, Aparecida S. Diamante M and Dolder H. Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. Int. J. Exp. Path. (۲۰۱۰), ۹۱, ۱۲۵-۱۳۱.

Dezfulian A-R, ShariatZadeh M A, Foundations of Modern Stereology, Quantitative three-dimensional calculations. Ayzh Press, ۲۰۰۴.

Dhawan M, Kachru DN, Tandon SK. Influence of thiamine and ascorbic acid supplementation on the antidotal efficacy of thiol chelators in experimental lead intoxication. Arch Toxicol, ۱۹۸۸; ۶۲(۴): ۳۰۱-۴.

Dodds, E.C., Lawson, W., ۱۹۳۶. Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus. Nature ۱۳۷, ۹۹۶.

Duarte TL, Lunec J: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. Free Radic Res ۲۰۰۵, ۳۹(۷):۶۷۱-۶۸۶.

El-Missiry Ma (۱۹۹۹). Enhanced testicular antioxidant system by ascorbic acid in alloxan diabetic rats. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol ۱۲۴: ۲۳۳-۷.

Elshaari F. A., Fatum A. E. and Sheriff D. S. S. Spermatozoa-an unique representation of Oxygen-Antioxidant paradox. Acta Medica Medianae ۲۰۱۰; ۴۹(۱):۴۸-۵۳.

Embree-Ku, M., Venturini, D., Boekelheide, K., ۲۰۰۲. Fas is involved in the p۵۳-dependent apoptotic response to ionizing radiation in mouse testis. Biol. Reprod. ۶۶, ۱۴۵۶-۱۴۶۱.

Erickson BE. Bisphenol A under scrutiny. Chemical and Engineering News. ۲ June ۲۰۰۸; ۸۶(۲۲):۳۶-۳۹.

Faris B, Ferrera R, Toselli P, Nambu J, Freanzblau C. Effect of varying amounts of asorbate on collagen, elastin and lysyl oxidase synthesis in aortic smooth muscle cell cultures. Biochim Biophys Acta ۱۹۸۴; ۷۹۷ (۱) ۷۱-۵.

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 ۲۰۰۳; ۱۱۲: ۱۲۴۳-۵.

Fiorini C, Tilloy-Ellul A, Chevalier S, Charuel C, Pointis G. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. Reprod Toxicol ۲۰۰۴; ۱۸: ۴۱۳-۲۱.

Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* ۱۹۹۱;۸۸(۲۴):۱۱۰۰۳-۶.

Franca L.R., Russell L.D. (۱۹۹۸). The testes of domestic animals. In: *Male Reproduction. A Multidisciplinary Overview*, pp. ۱۹۷-۲۱۹ (eds J. Regadera, R. Martinez-Garcia), Madrid: Churchill Livingstone.

Gartner Leslie P. James L Hiatt. *Histology*. Shiraz University Publication Center, ۲۰۰۶.

Gartner Leslie P. James L Hiatt. *Histology*. Shiraz University Publication Center, ۲۰۰۶

Griswold MD. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod* ۱۹۹۵; ۵۲:۲۱۱-۶.

Hanadi BA, Kelany AHM, Elqudsi FM, Ameen HA and El Karium SA. The possible protective role of antioxidant (Selenium, Vitamin E) in reducing smoking effects on testes of Albino Rats. *Mol Cell Biochem*. ۲۰۰۹ Jan; ۳۲۱(۱-۲):۳۷-۴۳.

Heather Caliendo for *PlasticsToday -- Packaging Digest*, June ۲۰, ۲۰۱۲ History of BPA.

Hikim, A.P., Lue, Y., Yamamoto, C.M., Vera, Y., Rodriguez, S., Yen, P.H., Soeng, K., Wang, C., Swerdloff, R.S., ۲۰۰۳. Key apoptotic pathways for heat-induced programmed germ cell death in the testis. *Endocrinology* ۱۴۴, ۳۱۶۷-۳۱۷۵.

Hiroshi Iida a, Kazue Maehara a, Masamichi Doiguchi a, Takayuki Mori a, Fumio Yamada^b Bisphenol A-induced apoptosis of cultured rat Sertoli cells – ۲۰۰۳. *Ibaraki* ۳۰۵-۸۶۸۷, Japan.

Howard C, Reed M. *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. Bios Scientific Publishers, Oxford, Unnited Kindom; ۱۹۹۸.

Hsu FS, Krook L, Pond WG, Duncan JR. Interactions of dietary calcium with toxic levels of lead and zinc in pigs. *J Nutr*, ۱۹۷۵; ۱۰۵: ۱۱۲-۸.

Junqueira, Luiz Carlos, Carneiro Jose, translated by M. Montazeri. *Basic histology*. Eleventh Edition, ۲۰۰۵, published by the venerable, third edition ۲۰۰۷.

McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K, and Robertson DM (۲۰۰۲) Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res* ۵۷:۱۴۹-۱۷۹.

Meehan T, Schlatt S, O'Bryan MK, de Kretser DM, Loveland KL. Regulation of germ cell and Sertoli cell development by activin, follistatin, and FSH. *Dev Biol* ۲۰۰۰;۲۲۰:۲۲۵-۳۷.

Narayana K (۲۰۰۸) An aminoglycoside antibiotic gentamycin induces oxidative stress, reduces antioxidant reserve and impairs spermatogenesis in rats. *J Toxicol Sci* ۳۳: ۸۵-۹۶.

Narayana K, Verghese S, et al. (۲۰۰۹). l-Ascorbic acid partially protects two cycles of cisplatin chemotherapy-induced testis damage and oligo-astheno-teratospermia in a mouse model. *Exp. Toxicol. Pathol.* ۶۱ (۶): ۵۵۳-۶۳.

Onunkwor B, Dosumu O, Odukoya O, Arowolo T, Ademuyiwa O. Biomarkers of lead exposure in petrol station attendants and auto-mechanics in Abeokuta, Nigeria: effect of ۲-week ascorbic acid supplementation. *July* ۲۰۰۴; ۱۷(۳): ۱۶۹-۱۷۶.

Pousti, I., Adib Moradi, M. (۲۰۰۳). Comparative Histology and Histiotechnique. University of Tehran. Publications, Tehran, Iran.

Sarita Murmu and Vinoy K. Shrivastava, ۲۰۱۲. Ameliorative Effects Of Vitamin-C Against Bisphenol-A. Toxicity In Liver Of Cirrhinus Mrigala (Ham.)

Simmons, K. (۲۰۰۵, February ۲۱). Rat Reproductive System. Retrieved December ۱۷, ۲۰۰۸, from <http://io.uwinnipeg.ca/~simmons/۱۶labman۰۵/lb^pg^htm>.

Simorangkir DR, Wreford NG, de Kretser DM. Impaired germ cell development in the testes of immature rats with neonatal hypothyroidism. J Androl, ۱۹۹۷, ۱۸:۱۸۶-۱۹۳.

Varsha G& Vinoy K. S., ۲۰۱۱, Protective role of vitamin C against lindane toxicity on the histo-architecture of the epididymis and vas deferens of male mice (Mus musculus)

Watanabe S, Wang RS, Miyagawa M, Kobayashi K, Suda M, Sekiguchi S, Honma T (۲۰۰۳) Imbalance of testosterone level in male offspring rats perinatally exposed to bisphenol A. Ind Health ۴۱, ۳۳۸-۴۱.

[Yoshiro Toyama](#), [Fumie Suzuki-Toyota](#), [Mamiko Maekawa](#), [Chizuru Ito](#), [Kiyotaka Toshimori](#), ۲۰۰۵. Adverse effects of bisphenol A to spermiogenesis in mice and rats

Zan, T., Tao, J., Tang, R.C., Liu, y., Huang, B., Zhou, J.Y., and et al. (۲۰۰۵). Effect of vitamin C antioxidative protection on human red blood cells, ۱۳ (۶), ۱۱۰۶.