View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Repository of Research and Investigative Information

مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره بیستم، شمارهٔ ۳، اسفند ۱۳۹۶، صفحه ۵۸-۵۰

اثر محافظتی ژل رویال بر روی بافت بیضه و خصوصیات اسپرم در موش های بالغ تحت تیمار با نیکوتین

فرنام آزاد (MSc)[1*]، وحید نجاتی (PhD)[1]، علی شالیزار جلالی (PhD)[2]، غلامرضا نجفی (PhD)[2]، فاطمه رحمانی (PhD)[1]

۱-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲-گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

دریافت: ۹۶/۷/۱۱، اصلاح: ۹۶/۱۱/۴، پذیرش: ۹۶/۱۱/۲۵

خلاصه

سابقه و هدف: نیکوتین به عنوان ترکیب دارویی، تاثیر نامطلوبی روی دستگاه تولیدمثلی نر دارد. از آنجائیکه ژل‌رویال با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی می‌تواند تنش اکسیداتیو را تعدیل کند. این مطالعه به منظور بررسی محافظتی ژل رویال روی بافت بیضه و فراسنجه‌های اسپرمی در موش‌های تحت‌تیمار با نیکوتین انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۳۶ موش نر بالغ به‌صورت تصادفی به شش گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه اول سرم فیزیولوژی، گروه دوم ژل رویال با دوز ۱۰۰ mg/kg/day و گروه‌های سوم و چهارم به ترتیب نیکوتین را با دوزهای ۰/۵۰ mg/kg/day و ۱ mg/kg/day دریافت کردند. گروه‌های پنجم و ششم به همراه نیکوتین به ترتیب دوزهای ۰/۵ mg/kg/day و ۱ mg/kg/day، ژل رویال دریافت نمودند. متعاقب توزین و تشریح، بیضه‌های چپ برای مطالعات بافت‌شناسی و اسپرم‌های اپیدیدیمی چپ جهت ارزیابی‌های اسپرمی استفاده شدند.

یافته ها: نیکوتین موجب کاهش معنی‌دار سلول‌های اسپرماتوگونی (۰/۵: ۳۶/۴۰±۲/۹۲ و ۱: ۳۱/۸۰±۵/۱۲) و افزایش معنی‌دار اسپرم‌های غیرمتحرک (۰/۵: ۳۶/۴۰±۲/۹۲ و ۱: ۳۱/۸۰±۵/۱۲)، مرده (۰/۵: ۱۹/۰۶±۰/۷۱ و ۱: ۲۵/۳۸±۱/۴۱) و غیرطبیعی (۰/۵: ۱۷/۰۷±۰/۶۸ و ۱: ۳۲/۲۵±۱/۲۷) در مقایسه با گروه شاهد (به ترتیب ۸/۱۲±۰/۲۷، ۱۱/۰۸±۱/۰۳ و ۸/۳۶±۰/۶۱) گردید ($p<0/05$). تجویز همزمان ژل‌رویال به طور قابل‌ملاحظه‌ای تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی (۰/۵+ژل‌رویال: ۴۳/۲۵±۳/۸۰ و ۱+ژل‌رویال: ۴۲/۲۲±۵/۲۸) و میزان اسپرم‌های غیرمتحرک (۰/۵+ژل‌رویال: ۱۱/۰۱±۱/۴۹ و ۱+ژل‌رویال: ۱۲/۳۶±۱/۲۱)، مرده (۰/۵+ژل‌رویال: ۱۱/۷۳±۰/۹۷ و ۱+ژل‌رویال: ۱۲/۳۱±۱/۰۷) و غیرطبیعی (۰/۵+ژل‌رویال: ۱۰/۶۲±۰/۸۵ و ۱+ژل‌رویال: ۱۱/۸۲±۰/۹۶) را در مقایسه با گروه‌های تحت‌درمان با نیکوتین بهبود بخشید.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که ژل رویال با بهبود ساختار بیضه و خصوصیات اسپرمی موجب کاهش سمیت‌های تولیدمثلی نیکوتین در موش می‌گردد.

واژه های کلیدی: نیکوتین، ژل رویال، بیضه، موش، اسپرم.

مقدمه

مصرف سیگار به عنوان یکی از مهم‌ترین معضلات سلامت عمومی، می‌تواند اثرات سوء بر باروری زنان و مردان داشته باشد (۲و۱). نیکوتین به عنوان یک آلکالوئید بسیار فرار از اجزا مهم دود سیگار، قادر به ایجاد آثار زیان آور در بدن می باشد (۳). شواهد روشنی وجود دارد که نیکوتین موجب افزایش تنش‌اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانتی در دستگاه تولیدمثلی نر می‌گردد (۴). از طرفی اسپرماتوزوآ به دلیل دارا بودن مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع در غشای پلاسمایی و میزان ناچیز آنتی اکسیدانت‌های سیتوپلاسمی، مستعد آسیب اکسیداتیو می‌باشد (۵). مطالعات نشان داده که تجویز نیکوتین در حیوانات آزمایشگاهی موجب کاهش وزن بیضه، افزایش بد شکلی‌های اسپرمی و آتروفی غدد ضمیمه، اپی دیدیم و مجرای دفران می‌گردد (۶). از طرف دیگر، ثابت شده است که دوز و زمان قرار گرفتن در معرض نیکوتین در موش‌های صحرایی با تغییرات مخرب در بافت بیضه ارتباط مستقیم دارد (۷). نیکوتین به راحتی از غشای سلول‌های بدن عبور می‌کند و قابلیت واکنش با برخی از اجزاء درون سلولی همچون پروتئین توبولین در سیتوپلاسم سلول‌های در حال تقسیم نظیر سلول‌های زایای جنسی را دارد و بدین ترتیب موجب اختلال در تقسیم سلول می‌گردد (۸). همچنین، گزارشات نشان می‌دهد که نیکوتین موجب تغییرات دژنراتیو در لوله‌های اسپرم ساز، کاهش اسپرماتوژنز و اختلال در عملکرد بیضه می‌شود (۹). مصرف نیکوتین می‌تواند به غشای سلولی و DNA اسپرم آسیب برساند و باعث القای آپوپتوز در سلول‌های بیضه شود (۱۰). همچنین مطالعات نشان می‌دهد تجویز نیکوتین در موش‌های صحرایی باعث ضخیم شدن تونیکا پروپریا به واسطه ایجاد افزایش در رشته‌های کلاژن لایه بازال، تخریب اتصالات بین‌سلولی سلول‌های سرتولی، ناهنجاری‌های کروموزومی، شکل‌گیری سلول‌های سرتولی با میتوکندری‌های چندشکلی، سلول‌های زایای دژنره شده، تجمع بیش از حد قطرات چربی در سیتوپلاسم اسپرم و ناهنجاری‌های مورفولوژیک در اسپرم می‌شود (۱۱). از سوی دیگر، سمیت نیکوتین ممکن است به علت تغییر در نسبت رشته‌های کلاژن و سلول‌های انقباضی میوئید باشد که ممکن است از انتشار

▣ این مقاله حاصل پایان نامه فرنام آزاد دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بافت شناسی و جنین شناسی دانشگاه ارومیه می باشد.
* مسئول مقاله: فرنام آزاد
آدرس: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی. تلفن: ۰۴۴-۳۲۷۵۵۲۹۵
E-mail: farnam.azad@hotmail.com

مناسب اسپرم از اپی‌تلیوم زایا به حفره میانی لوله‌های اسپرم ساز جلوگیری کند (۱۲و۱۱). همچنین گزارشات پیشین نشان داده است که تجویز نیکوتین علاوه بر کاهش تعداد اسپرم، تحرک و زنده مانی اسپرم‌ها موجب افزایش میزان بد شکلی و آپوپتوز اسپرمی می‌شود(۱۳). ژل رویال به عنوان غذای ملکه زنبورهای عسل شناخته می‌شود و توسط لاروهای جوان و ملکه مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ماده نقش مهمی در تغذیه ملکه دارد و از غدد زیرحلقی و تحت‌فکی زنبورهای کارگر جوان ترشح می‌شود. ژل رویال ماده‌ای به رنگ سفید شیری است که دارای بوی تند و مزه ای میوه‌ای و ارزش غذایی فراوان است. این ژل عامل بزرگ‌تر بودن جثه، قدرت باروری زیاد و بیشتر بودن طول عمر ملکه است (۱۴). ژل رویال به عنوان یک سوپر غذا متشکل از ۶۶٪ آب، ۱۵٪ شکر، ۵٪ لیپید و ۱۳٪ از پروتئین ها، اسیدهای آمینه ضروری و ویتامین‌ها می‌باشد (۱۵).

همچنین ژل رویال دارای انواع فعالیت‌های بیولوژیکی در سلول‌ها و بافتهای مختلف می‌باشد که اثرات تحریکی بر اندام‌های مختلف بدن داشته و می‌تواند عملکرد آنها را در برابر تنش اکسیداتیو بهبود بخشد (۱۷و۱۶). علاوه بر این، ژل رویال به عنوان یک محرک کمک کننده به حفظ فعالیت منظم و طبیعی هورمون‌ها شناخته می‌شود که در درمان مشکلات از کار افتادگی جنسی مزمن ارزشمند است (۱۸). تاکنون گزارشی دال بر اثرات زیان بخش ژل رویال بر دستگاه‌های زیستی وجود ندارد و با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانتی این ماده در برابر تنش اکسیداتیو، اثرات تجویز خوراکی ژل رویال بر ساختار بافتی بیضه و فراسنجه‌های اسپرمی در موش‌های تحت درمان با نیکوتین مورد بررسی قرار نگرفته است. لذا، هدف از این مطالعه بررسی اثرات محافظتی احتمالی ژل رویال بر روی وزن بدن و بیضه، ساختار بافت بیضه و میزان تحرک، قابلیت زنده‌مانی و ریخت‌شناسی اسپرم‌های اپیدیدیمی در برابر سمیّت‌های تولیدمثلی نیکوتین در موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی نژاد Balb/c می‌باشد.

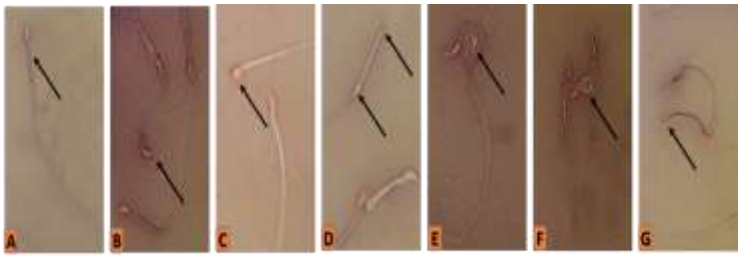
مواد و روش‌ها

محلول نیکوتین ($C_{10}H_{14}N_2$) (Sigma-Germany) از شرکت سیگما خریداری شد و به وسیله سالین نرمال دو دوز ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم از آن تهیه گردید. ژل رویال مورد استفاده در این مطالعه از کندوهای زنبورستان‌های شهرستان ارومیه در شهریور ماه سال ۱۳۹۵ تهیه شد و پس از تایید توسط هیئت علمی گروه بهداشت و مواد غذایی دانشکده دامپزشکی در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم تهیه گردید. در این مطالعه تجربی، تعداد ۳۶ سر موش نر بالغ نژاد Balb/c با سن تقریبی ۵±۶۰ از خانه حیوانات دانشکده علوم دانشگاه ارومیه خریداری شد و در اتاقی با دمای محیطی ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵±۷۵ درصد، چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و در قفس استیلی با اندازه ۳۵ در ۵۵ سانتی متر نگهداری شدند. آب آشامیدنی حیوانات در تمام طول آزمایش آب لوله کشی شهری و تغذیه به صورت غذای مخصوص موش (پلیت) بود.

در همه مراحل اجرای این پژوهش، قواعد مربوط به اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی (دستورالعمل کمیسیون اروپا (86/609/EEC)) رعایت گردید. برای سازگاری حیوانات با محیط، به مدت ۲ هفته در محیط آزمایشگاه و درون قفس نگهداری شدند. پس از این دوره حیوانات به صورت تصادفی به طور مساوی (۶ حیوان در هر گروه) به ۶ گروه تقسیم شدند و پس از ۳۵ روز مورد بررسی قرار گرفتند. گروه اول به عنوان گروه شاهد ۰/۲۰ ml سالین نرمال به صورت خوراکی دریافت کردند. گروه دوم فقط ۰/۲۰ ml ژل رویال با دوز ۱۰۰ mg/kg/day به صورت خوراکی دریافت کردند. گروه سوم ۰/۲ ml نیکوتین با دوز ۰/۵۰ mg/kg/day به صورت خوراکی دریافت کردند. گروه چهارم ۰/۲ ml نیکوتین با دوز ۱ mg/kg/day به صورت خوراکی دریافت کردند. گروه پنجم ۰/۲ ml نیکوتین با دوز ۰/۵ mg/kg/day و ۰/۲ ml ژل رویال با دوز ۱۰۰ mg/kg/day به صورت خوراکی دریافت کردند.

در گروه ششم ۰/۲ ml نیکوتین با دوز ۱ mg/kg/day و ۰/۲ ml ژل رویال با دوز ۱۰۰ mg/kg/day به صورت خوراکی تجویز شد. در پایان دوره تیمار، پس از گذشت ۲۴ ساعت از آخرین تیمار، تمامی موش های موجود در شش گروه ذکر شده پس از وزن‌کشی با دریافت کتامین بیهوش و متعاقباً آسان‌کشی شدند. به منظور ارزیابی خصوصیات اسپرم، متعاقب کالبدگشایی، ابتدا اپیدیدیم زیر لوپ با بزرگنمایی ۲۰ برابر از بافت بیضه جدا و بافت‌های اطراف آن تمیز گردید. بلافاصله دم اپیدیدیم درون پتری دیش‌های حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت HTF(Human Tubal fluid) قرارگرفت. سپس، دم اپیدیدم در داخل محیط کشت به قطعات کوچک خرد شد و به مدت ۲۰ دقیقه در درون محیط کشت در انکوباتور باقی ماند تا امکان خروج اسپرمها از اپیدیدیم فراهم آید. در نهایت، سوسپانسیون حاوی اسپرم با استفاده از محیط کشت به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق گردید. تمام وسایل مورد استفاده و محیط کشت قبل از مصرف جهت جلوگیری از ایجاد شوک حرارتی و آسیب دیدن اسپرم‌ها، در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شدند (۱۹). جهت تعیین میزان تحرک اسپرم‌ها، یک قطره از محلول رقیق شده فوق بر روی لام میکروسکوپی قرار داده شد و ۱۰ عدد میدان دید میکروسکوپی با درشت نمایی ۴۰۰ برابر مورد بررسی قرار گرفت.

سپس، میانگین کل اسپرم‌های غیرمتحرک در این ۱۰ میدان دید به عنوان درصد تحرک ثبت گردید (۱۹). جهت ارزیابی تعداد اسپرم‌ها با استفاده از هموسیتومتر، ۱۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده اسپرم بر روی هموسیتومتر قرار داده شد و به مدت ۵ دقیقه بدون حرکت باقی ماند تا تحرک اسپرم‌ها کاهش یابد. تعداد اسپرم‌ها در هر میلی‌لیتر با استفاده از فرمول $n \times ۵۰۰۰۰ \times d$ و توسط میکروسکوپ نوری با درشت‌نمایی ۴۰۰ برابر محاسبه گردید، که n تعداد اسپرم-های شمارش شده در پنج مربع هموسیتومتر و d، عکس رقت سوسپانسیون حاوی اسپرم می‌باشد (۱۹). به منظور ارزیابی درصد اسپرم‌های مرده و نیز اسپرم‌های غیرطبیعی از لحاظ مورفولوژی، رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین مورد استفاده قرار گرفت. در این روش تشخیص اسپرم‌های زنده از اسپرم‌های مرده بر این اصل استوار است که در اثر آسیب دیدن غشاء پلاسمایی، اسپرم‌ها در برابر رنگ مذکور نفوذپذیر می‌گردند. بنابراین، آن دسته از اسپرم‌هایی که هر یک از قطعات سر، گردن و یا دم آن‌ها رنگ گرفته باشد، به عنوان اسپرم‌های مرده در نظر گرفته می‌شوند. اسپرم‌هایی نیز که دارای بقایای سیتوپلاسمی و سایر اختلالات مورفولوژیک بودند، به عنوان اسپرم‌های غیرطبیعی در نظر گرفته شدند (شکل ۱). تعداد ۲۰۰ اسپرم برای هر نمونه با درشت نمایی ۴۰۰ برابر مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل در قالب درصد بیان شدند (۱۹). پس از کالبدگشایی، بیضه حیوانات توسط ترازوی آزمایشگاهی با دقت (۰/۰۰۱ gr) اندازه گیری و نمونه‌های بافتی بیضه با رعایت اصول استریل برداشته شده و بیضه‌های سمت چپ جهت ثبوت به محلول ثبوتی فرمالین ۱۰٪ منتقل شدند (۲۰).



شکل ۱. برخی از ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم در گروه های تحت تیمار با نیکوتین A: اسپرم طبیعی B: بدون دم C: سر دایره‌ای شکل D: بدون سر و حاوی قطره سیتوپلاسمی پروکسیمال E: سر خمیده F: دم مارپیچ G: دم گره خورده. رنگ آمیزی ائوزین- نگروزین. بزرگنمایی ۴۰۰×

نمونه‌های بافتی بیضه چپ پس از ثبوت به همراه مشخصات درون ظروف مخصوص قرار گرفتند و متعاقب طی مراحل پاساژ بافتی، با استفاده از پارافین مذاب قالب‌گیری شدند. سپس، با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر از قالب‌های پارافینی تهیه گردید و در نهایت رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین- ائوزین و پریودیک اسید شیف جهت رنگ‌آمیزی نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در مقاطع بافتی تهیه شده علاوه بر شمارش سلول‌های اسپرماتوژنیک و سرتولی بر اساس مورفولوژی سلول ها (۲۱)، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخامت اپی‌تلیوم زایا نیز با کمک عدسی چشمی مدرج اندازه گیری و ثبت شد. جهت شمارش سلول‌ها در هر گروه تعداد ۱۰ برش به صورت تصادفی انتخاب شد و در هر برش تعداد ۱۰ لوله اسپرم ساز، به صورت تصادفی اندازه‌گیری شده و سلول‌ها شمارش شدند. همچنین، برای ارزیابی اسپرماتوژنز از شاخص جانسن استفاده شد. برای این منظور از مقطع عرضی ۱۰۰ لوله اسپرم‌ساز در هر حیوان استفاده شد و به هر لوله بر اساس الگوی دسته بندی جانسن (جدول۱) نمره ۱ تا ۱۰ تعلق گرفت (۲۲). مقاطع بافتی همچنین به منظور مطالعه ترکیبات کربوهیدارتی، به وسیله روش پریودیک-اسید-شیف (PAS) رنگ آمیزی شدند که در این روش واکنش پاس مثبت به رنگ قرمز قابل مشاهده می‌باشد (۲۳). داده‌های این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ آزمون آماری از آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون توکی تجزیه و تحلیل شدند و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول۱. ارزیابی اسپرماتوژنز براساس شاخص جانسن

ظاهر هیستوپاتولوژی	نمره
اسپرماتوژنسیس کامل در تمام توبول ها	۱۰
تعداد زیادی اسپرماتید دیرس، توبولار اپی تلیوم نامنظم	۹
تعداد کمی اسپرماتید دیرس	۸
بدون اسپرماتید دیرس، تعداد زیادی اسپرماتید زودرس	۷
بدون اسپرماتید دیرس، توقف در مرحله اسپرماتید زودرس	۶
تعداد زیادی اسپرماتوسیت بدون سلول های اسپرماتید	۵
توقف در اسپرماتوسیت اولیه	۴
فقط سلول های اسپرماتوگونیا	۳
فقط سلول سرتولی	۲
توبولار اسکلروسیس	۱

یافته ها

وزن بدن و بیضه: مطالعه حاضر نشان داد که میانگین وزن بدن و بیضه حیوانات در گروه‌های تحت درمان با نیکوتین نسبت به گروه شاهد و ژل رویال به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش یافت. حال آن که در گروه‌های دریافت کننده ژل رویال به همراه نیکوتین در مقایسه با گروه‌های دریافت کننده نیکوتین به تنهایی افزایش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در وزن بدن و بیضه مشاهده گردید (جدول ۲).

ارزیابی خصوصیات اسپرم‌های اپیدیدیمی: نتایج مربوط به ارزیابی فراسنجه‌های اسپرمی نشان داد که تجویز نیکوتین به صورت وابسته به دوز باعث کاهش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) میانگین تعداد اسپرم و افزایش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) درصد اسپرم مرده، بی‌حرکت و اسپرم‌های با مورفولوژی غیر طبیعی نسبت به گروه شاهد و ژل رویال می شود، از طرف دیگر تجویز همزمان ژل رویال با نیکوتین افزایش معنی دار ($p<۰/۰۵$) تعداد اسپرم و کاهش معنی دار ($p<۰/۰۵$) درصد اسپرم مرده، بی حرکت و اسپرم های با مورفولوژی غیر طبیعی را نسبت به گروه های دریافت کننده نیکوتین به تنهایی، موجب گردید (نمودارهای ۱ و ۲).

شمارش سلول‌های زایا و سرتولی بیضه: نتایج مربوط به شمارش سلول‌های زایا و سرتولی نیز نشان داد که میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و سلول های سرتولی در گروه های دریافت کننده نیکوتین در هر دو دوز دارای اختلاف معنی داری ($p<۰/۰۵$) با گروه شاهد می‌باشد (جدول۳). از طرف دیگر تجویز همزمان ژل رویال به همراه نیکوتین، افزایش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) را در تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک و سرتولی نسبت به گروه های دریافت کننده نیکوتین به تنهایی، موجب گردید (جدول ۳).

ارزیابی اسپرماتوژنز: نتایج مربوط به ارزیابی اسپرماتوژنز مشخص نمود که در گروه‌های دریافت کننده نیکوتین در هر دو دوز کاهش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در شاخص جانسن نسبت به گروه‌های شاهد و ژل رویال وجود دارد. از سوی دیگر، در گروه‌های دریافت کننده ژل رویال به همراه نیکوتین بهبود معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در پیشرفت اسپرماتوژنز در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده نیکوتین به تنهایی، مشاهده گردید (نمودار ۳).

ارزیابی مورفومتریک لوله‌های اسپرم‌ساز: در ارزیابی‌های مورفومتریک، ضخامت اپی‌تلیوم زایا و قطر لوله‌های اسپرم ساز بیضه در گروه‌های دریافت کننده نیکوتین به صورت وابسته به دوز در مقایسه با گروه‌های شاهد و ژل رویال به طور معنی-داری ($p<۰/۰۵$) کاهش نشان داد. در حالی که درگروه‌های نیکوتین+ژل رویال در مقایسه با گروه‌های تحت درمان با نیکوتین افزایش معنی‌داری ($p< ۰/۰۵$) در فراسنجه‌های بافت‌شناسی فوق مشاهده گردید (جدول ۴).

ریخت‌شناختی بافت بیضه: ارزیابی مورفولوژی بافت بیضه نشان داد که در گروه-های شاهد و ژل رویال، لوله‌های اسپرم‌ساز و اپی‌تلیوم زایای آن‌ها دارای ساختاری طبیعی می‌باشند. در بیضه موش‌های تحت درمان با نیکوتین آتروفی لوله های اسپرم ساز، ادم بافتی و کاهش ارتفاع اپی‌تلیوم زایا مشهود بود. اپی‌تلیوم زایای لوله‌های اسپرم‌ساز این حیوانات پیوستگی خود را از دست داده بود و در برخی نواحی واکوئل‌ها در اپی‌تلیوم اسپرماتوژنیک قابل‌مشاهده بودند. در گروه‌های دریافت‌کننده ژل رویال به همراه نیکوتین آسیب‌ها و تغییرات بافتی بیضه به میزان قابل‌توجه‌ای کاهش یافته بود.

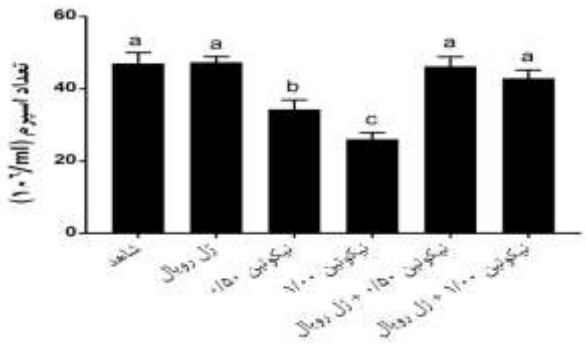
همچنین، متعاقب رنگ آمیزی PAS آشکار گردید که در گروه‌های شاهد و ژل رویال، سلول‌های لیدیگ دارای بیشترین واکنش به رنگ آمیزی PAS بودند

و اپی‌تلیوم زایای لوله‌های اسپرم‌ساز نیز واجد واکنش PAS مثبت بودند (شکل۲). در گروههای تحت درمان با نیکوتین واکنش به رنگ‌آمیزی PAS در سلول‌های لیدیگ و اپی‌تلیوم زایای لوله‌های اسپرم‌ساز به طور مشخصی کاهش نشان داد. در حالی که در گروه‌های دریافت کننده نیکوتین+ژل رویال میزان واکنش به رنگ-آمیزی PAS در سلولهای لیدیگ و اپی‌تلیوم زایای لوله‌های اسپرم‌ساز تقریباً مشابه گروه شاهد بود (شکل۲).

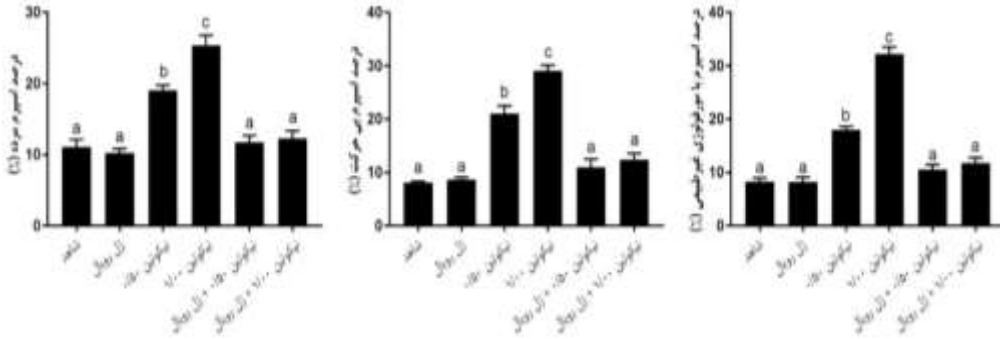
جدول ۲. مقایسه وزن بدن و بیضه موش ها در گروه‌های مختلف آزمایشی

گروه‌ها	وزن بدن قبل از دوره تیمار (گرم) Mean±SD	وزن بدن بعد از پایان دوره تیمار (گرم) Mean±SD	وزن بیضه (میلی گرم) Mean±SD
شاهد	۳۱/۶۹±۱/۲۵^{a}	۳۲/۹۸±۲/۴۸^{a}	۹۷/۶۴±۳/۱۱^{a}
ژل رویال	۳۱/۱۲±۱/۱۶^{a}	۳۲/۰۰±۲/۶۹^{a}	۹۷/۵۱±۴/۵۹^{a}
نیکوتین ۰/۵۰	۳۲/۰۱±۱/۴۲^{a}	۲۷/۴۶±۲/۶۹^{b}	۷۹/۴۲±۳/۴۸^{b}
نیکوتین ۱/۰۰	۳۱/۰۹±۱/۰۹^{a}	۲۵/۳۸±۲/۵۱^{b}	۶۸/۱۲±۲/۹۹^{c}
نیکوتین ۰/۵۰+ژل رویال	۳۱/۷۴±۱/۰۶^{a}	۳۱/۴۴±۱/۶۹^{a}	۹۶/۶۹±۴/۵۱^{a}
نیکوتین ۱/۰۰+ژل رویال	۳۱/۷۴±۱/۵۷^{a}	۳۲/۶۶±۱/۳۰^{a}	۹۴/۵۸±۲/۲۷^{a}

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشند (p< ۰/۰۵).

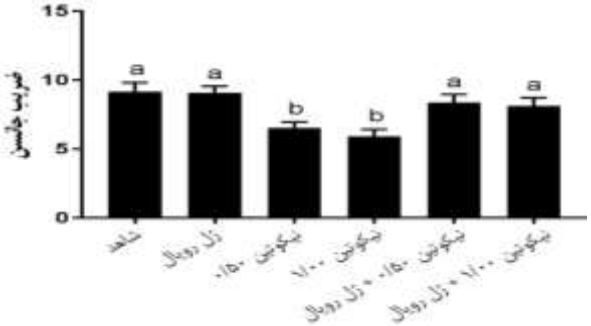


نمودار ۱. مقایسه تعداد اسپرم در گروه های مختلف آزمایشی.



نمودار ۲. مقایسه درصد اسپرم‌های مرده، بی‌حرکت و دارای مورفولوژی غیر طبیعی در گروه‌های مختلف آزمایشی

حروف غیرمشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار می باشند (p< ۰/۰۵)



نمودار ۳. مقایسه میانگین ضریب جانسن در گروه‌های مختلف آزمایشی

حروف غیرمشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشند (p< ۰/۰۵).

جدول ۳. مقایسه تعداد سلول‌های اسپرماتوگوتی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سرتولی در گروه‌های مختلف آزمایشی

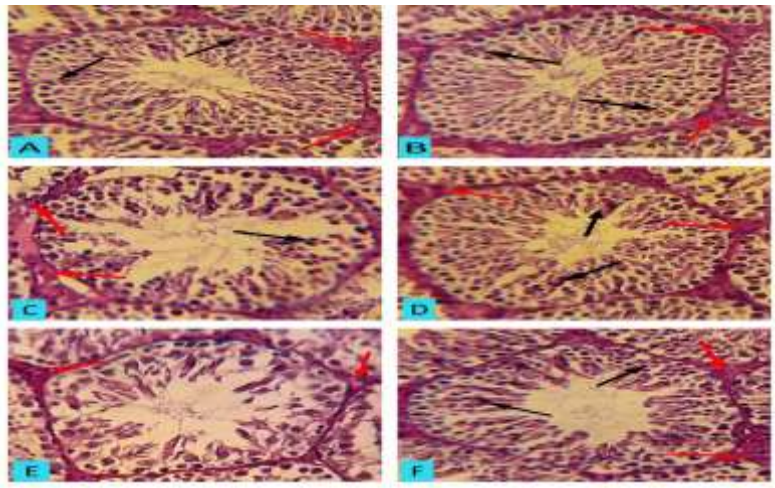
گروه / متغیر	اسپرماتوگونی Mean±SD	اسپرماتوسیت Mean±SD	اسپرماتید Mean±SD	سرتولی Mean±SD
شاهد	۴۸/۶۷±۴/۲۱^{a}	۵۰/۱۹±۳/۹۹^{a}	۱۰۶/۷۸±۱۴/۶۸^{a}	۱۶/۸۰±۱/۲۷^{a}
ژل رویال	۴۸/۹۴±۴/۲۰^{a}	۴۸/۷۹±۲/۴۱^{a}	۱۱۲/۸۴±۲۸/۳۵^{a}	۱۷/۳۳±۱/۷۱^{a}
نیکوتین ۰/۵۰	۳۶/۴۰±۲/۹۲^{b}	۳۹/۲۳±۲/۰۷^{b}	۷۰/۶۹±۹/۰۴^{b}	۱۳/۴۸±۱/۳۷^{b}
نیکوتین ۱	۳۱/۸۰±۵/۱۲^{b}	۳۱/۱۱±۴/۰۱^{c}	۶۸/۱۴±۴/۰۵^{b}	۱۳/۱۱±۱/۵۳^{b}
نیکوتین ۰/۵۰+ژل رویال	۴۳/۲۵±۳/۸۰^{a}	۴۹/۳۴±۵/۸۸^{a}	۹۸/۳۸±۱۰/۸۲^{a}	۱۶/۳۶±۰/۸۱^{a}
نیکوتین ۱+ژل رویال	۴۲/۲۲±۵/۲۸^{a}	۴۶/۶۶±۴/۳۰^{a,b}	۹۶/۷۷±۵/۹۶^{a}	۱۶/۳۷±۱/۴۴^{a}

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($p< ۰/۰۵$).

جدول ۴. مقایسه میانگین فراسنجه‌های مورفومتریک لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه در گروه‌های مختلف آزمایشی

گروه / متغیر	قطر لوله های اسپرم ساز (میکرومتر) Mean±SD	ضخامت اپی تلیوم زایا (میکرومتر) Mean±SD
شاهد	۱۵۰/۰۲±۳/۸۷^{a}	۳۸/۹۳±۳/۶۵^{a}
ژل رویال	۱۵۳/۵۸±۵/۰۶^{a}	۳۹/۰۳±۴/۷۶^{a}
نیکوتین ۰/۵	۱۲۶/۸۸±۴/۹۱^{b}	۲۶/۲۹±۲/۸۸^{b}
نیکوتین ۱	۶۰/۴۴±۶/۴۴^{b}	۲۲/۴۴±۲/۷۰^{b}
نیکوتین ۰/۵+ژل رویال	۱۴۴/۴۲±۵/۴۸^{a}	۳۸/۳۱± ۳/۹۶^{a}
نیکوتین ۱+ژل رویال	۱۳۷/۸۴±۵/۱۶^{a}	۳۸/۱۸±۴/۲۸^{a}

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($p< ۰/۰۵$).



شکل ۲. مقطع عرضی بافت بیضه درگروه های شاهد (A)، ژل رویال (B)، نیکوتین ۰/۵۰ (C)، نیکوتین ۰/۵۰+ژل رویال (D)، نیکوتین ۱ (E) و نیکوتین ۱+ژل رویال (F). در گروه های A و B سازمان بندی لوله های اسپرم ساز و روند اسپرماتوژنز طبیعی می‌باشد و دانه های PAS مثبت در سلول های لیدیگ (پیکان‌های قرمز رنگ) و اپی‌تلیوم زایا (پیکان‌های سیاه رنگ) مشاهده می-گردند. در گروههای C و E لوله‌های اسپرم‌ساز ساختار طبیعی خود را از دست داده‌اند و روند اسپرماتوژنز نیز مختل شده است. هم چنین، میزان واکنش PAS مثبت در اپی‌تلیوم زایای لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه گروه C به طور بارزی کاهش یافت و در گروه E دانه های PAS مثبت در اپی تلیوم زایا مشاهده نشد و در سلولهای لیدیگ نیز کاهش قابل توجهی نشان داد. در گروه های D و F بهبود ساختار لوله های اسپرم‌ساز و روند اسپرماتوژنز مشاهده گردید. میزان واکنش PAS مثبت نیز در سلول‌های لیدیگ این گروهها افزایش نشان داد و در اپی‌تلیوم زایا نیز واکنش PAS مثبت مشابه گروه شاهد مشاهده شد (رنگ آمیزی PAS، بزرگنمایی ۶۰۰×).

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه تجویز ژل رویال در حیوانات تحت درمان با نیکوتین در هر دو دوز، موجب بهبود آسیب‌های بیضه و ناهنجاری‌های اسپرمی در مقایسه با موش-های دریافت کننده نیکوتین به تنهایی، شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که کاهش معنی‌داری در وزن موش‌هایی که نیکوتین دریافت کرده بودند، وجود دارد که با مطالعات پیشین در حیوانات آزمایشگاهی در رابطه با نقش نیکوتین در کاهش قابل ملاحظه وزن بدن، مطابقت دارد (۲۴). چنین به نظر می‌رسد که نیکوتین به علت نقش مهاری در مصرف غذا و جلوگیری از سنتز پروتئین و نیز کاهش توده پروتئینی و چربی موجب کاهش وزن بدن می شود (۲۵). همچنین، نتایج بررسی حاضر نشان داد که تجویز نیکوتین باعث کاهش وزن نسبی بیضه می‌شود که شاخص مهمی جهت ارزیابی سمیت های تولیدمثلی در حیوانات نر به شمار می‌آید. بررسی‌ها در این مطالعه نشان داد که نیکوتین در هر دو دوز سبب کاهش کیفیت و کمیت اسپرم‌های اپیدیمی می‌شود. مطالعه حاضر همسو با مطالعات پیشین (۲۶و۲۷) نشان داد که نیکوتین سبب کاهش معنی‌دار تعداد اسپرم

در هر میلی‌لیتر و افزایش معنی‌دار اسپرم‌های مرده، غیرمتحرک و اسپرم‌های با مورفولوژی غیرطبیعی می‌شود. نیکوتین به واسطه کاهش و تخریب سلول‌های لیدیگ و سرتولی که در ترشح تستوسترون و تبدیل سلول‌های اسپرماتوگونی به اسپرم نقش دارند، می‌تواند موجب افزایش مرگ و میر اسپرم‌ها شود (۲۸). دود سیگار نیز از مواد مضری مانند نیکوتین تشکیل شده است و گزارشات پیشین نیز نشان داده‌اند که سیگار باعث افزایش ناهنجاری‌های مورفولوژیکی و تغیرات آپوپتوزی در اسپرم‌های اپیدیدیمی می شود (۲۹).

در مطالعه حاضر شمارش سلول‌های اسپرماتوژنیک بافت بیضه موش‌های تحت تیمار با نیکوتین کاهش معنی‌داری را در تعداد سلول‌های زایا (اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید) و همچنین تعداد سلول‌های سرتولی نشان داد که با مطالعات پیشین صورت گرفته در این زمینه همخوانی داشت (۹و۳۰). مطالعات انجام پذیرفته در این راستا همچنین نشان داده است که تجویز نیکوتین در موش با کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک و اختلال در روند تکثیر سلول‌های زایا همراه است که این امر یافته‌های حاصل از ارزیابی اسپرماتوژنز در این مطالعه را نیز تایید می‌کند (۷). هم راستا با یافته‌های پژوهش حاضر گزارشات پیشین نیز نشان داده‌اند که نیکوتین به واسطه کاهش جمیعت سلول‌های زایای بیضه موجب کاهش قابل‌توجه قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخامت اپی‌تلیوم زایا و همچنین افزایش فضای حفره داخلی لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه می‌گردد (۳۱). کربوهیدرات ها به ویژه گلوکز منبع اصلی و ضروری انرژی در تقسیمات سلول‌های میتوزی می‌باشند و سد خونی – بیضه ای مسیر اصلی انتقال گلوکز به لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه می‌باشد (۳۲). سلول‌های زایای بیضه نیز از لاکتات به عنوان منبع انرژی و مسئول تحریک سنتز پروتئین و RNA بهره می‌برند (۳۳). در این مطالعه، اپی-تلیوم زایای لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه گروه‌های دریافت کننده نیکوتین واکنش ضعیفی به رنگ‌آمیزی PAS نشان داد که این امر می‌تواند نشان‌دهنده اختلال در نقل و انتقال گلوکز باشد (۳۴). نتایج بررسی‌های این مطالعه همچنین نشان داد که ژل رویال می تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت در مقابل اثرات سمی نیکوتین در دستگاه تولیدمثل نقش محافظتی قابل‌توجه‌ای داشته باشد، همچنان‌که گزارشات پیشین نیز از نقش محافظتی چشمگیر این ماده در برابر اختلالات تولیدمثلی ناشی از بلئومایسین در موش‌های صحرایی نر و نیز آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از اکسی‌متولون در بافت بیضه موش حکایت دارند (۳۶و۳۵).

همسو با این یافته ها، بررسی‌های اخیر در این رابطه همچنین نشان داده است که ژل رویال به سبب دارا بودن فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانتی قابل ملاحظه قادر به بهبود عوارض ناشی از دیابت در بیضه موش‌های صحرایی می‌باشد (۳۷). براساس نتایج این مطالعه مشخص شد که نیکوتین موجبات آسیب بافت بیضه، کاهش کمیت و کیفیت اسپرم و همچنین بر هم خوردن چرخه متابولیسمی کربوهیدرات‌ها در بافت بیضه موش را فراهم می‌آورد. در حالی که ژل رویال به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت بالقوه قادر به بهبود آسیب‌های بیضه و ناهنجاری های اسپرمی در سمیت‌های تولیدمثلی ناشی از نیکوتین در موش می‌باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از آقای دکتر علی کریمی کارشناس آزمایشگاه بافت‌شناسی و جنین‌شناسی دانشکده دامپزشکی و تمام کسانی که در انجام این مطالعه یاری نمودند، تشکر و قدردانی می گردد.

The Protective Effect of Royal Jelly on Testicular Tissue and Sperm Parameters in Adult Mice Treated with Nicotine

F. Azad (MSc)•[1], V. Nejati (PhD)[1], A. Shalizar Jalali (PhD)[2], Gh. Najafi (PhD)[2], F. Rahmani (PhD)[1]

1. Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R.Iran
2. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 20(3). ; Mar 2018; PP: 50-8
Received: Oct 3rd 2017, Revised: Jan 24th 2018, Accepted: Feb 14th 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: As a medicinal compound, nicotine has adverse effects on the male reproductive system. Since royal jelly can modify the oxidative stress through its antioxidant properties, this study was conducted to investigate the protective effect of royal jelly on testicular tissue and sperm parameters in adult mice treated with nicotine.

METHODS: In this experimental study, 36 adult male mice were randomly divided into six groups of six. The first group received physiologic serum, the second group received royal jelly at 100 mg / kg / day, and the third and fourth groups received nicotine at 0.5 mg / kg / day and 1 mg / kg / day, respectively. The fifth and sixth groups received 0.5 mg / kg / day and 1 mg / kg / day royal jelly in addition to nicotine, respectively. After weighing and dissection, left testicles were used for histological studies and left epididymal sperm were used for sperm evaluations.

FINDINGS: Nicotine caused a significant decrease in spermatogonial cells (0.5: 36.40±2.92 and 1: 31.80±5.12) and significant increase in non-motile (0.5: 36.40±2.92 and 1: 31.80±5.12), dead (0.5: 19.06±0.71 and 1: 25.38±1.41) and abnormal (0.5: 17.07±0.68 and 1: 32.25±1.27) sperm compared with the control group (8.12±0.27, 11.08±1.03 and 8.36±0.61, respectively) ($p<0.05$). The co-administration of royal jelly significantly reduced the spermatogonial cell count (0.5+royal jelly: 43.25±3.80 and 1+royal jelly: 42.22±5.28) and improved the amount of non-motile (0.5+royal jelly: 11.01±1.49 and 1+royal jelly: 12.36±1.21), dead (0.5+royal jelly: 11.73±0.97 and 1+royal jelly: 12.31±1.07) and abnormal (0.5+royal jelly: 10.62±0.85 and 1+royal jelly: 11.82±0.96) sperm compared with groups treated with nicotine.

CONCLUSION: The results of the study showed that royal jelly reduces reproductive toxicity of nicotine in mice by improving the testicular structure and sperm parameters.

KEYWORDS: *Nicotine, Royal Jelly, Testicles, Mice, Sperm.*

Please cite this article as follows:

Azad F, Nejati V, Shalizar Jalali A, Najafi Gh, Rahmani F. The Protective Effect of Royal Jelly on Testicular Tissue and Sperm Parameters in Adult Mice Treated with Nicotine. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(3):50-8.

•Corresponding Author; F. Azad (MSc)
Address: Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R.Iran.
Tel: +98 44 32755295
E-mail: farnam.azad@hotmail.com

References

1.Mostafa T. Cigarette smoking and male infertility. J Adv Res. 2010;1(3):179-86.
2.Camlin NJ, McLaughlin EA, Holt JE. Through the smoke: use of in vivo and in vitro cigarette smoking models to elucidate its effect on female fertility. Toxicol Appl Pharmacol. 2014;281(3):266-75.
3.Kavitharaj NK, Vijiaymmal Pl. Nicotine administration induced changes in the gonadal function in male rats. Pharmacol. 1999;58(1):2-7.
4.Erat M, Ciftci M, Gumustekin K, Gul M. Effects of nicotine and vitamin E on glutathione reductase activity in some rat tissues in vivo and in vitro. Eur J Pharmacol. 2007;554(2):92-7.
5.Elshaari FA, Fatum AE, Sheriff DS. Spermatozoa-a unique representation of oxygen-antioxidant paradox. Acta Med Median. 2010;49(1):48-53.
6.Reddy S, Londonkar R, Reddy SO, Patil SB. Testicular changes due to graded doses of nicotine in albino mice. Indian J Physiol Pharmacol. 1998;42(2):276-80.
7.Khajeh Jahromi S, Mohammadghasemi F, Hajizadeh Fallah H. Evaluation of proliferative activity of adult mouse male germ cells following administration of different doses of nicotine. J Iran Anat Sci. 2011;9(36):229-40.
8.Tutka P, Mosiewicz J, Wielosz M. Pharmacokinetics and metabolism of nicotine. Pharmacol Rep. 2005;57(2):143-53.
9.Nesseim WH, Haroun HS, Mostafa E, Youakim MF, Mostafa T. Effect of nicotine on spermatogenesis in adult albino rats. Andrologia. 2011;43(6):398-404.
10.Arabi M. Nicotinic infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. Andrologia. 2004;36(5):305-10.
11.Aydos K, Guven MC, Can B, Ergun A. Nicotine toxicity to the ultrastructure of the testis in rats. Bob J Univ Int. 2001;88(6):622-6.
12.Ahmadnia H, Ghanbari M, Moradi MR, Khaje-Dalouee M. Effect of cigarate smoke on spermatogenesis in rats. Urol J. 2007;4(3):159-63.
13.Khosh AH, Hasanzadeh S, Jalali AS. Ameliorative effects of Achillea millefolium inflorescences alcoholic extract on nicotine-induced reproductive toxicity in male rat: Apoptotic and biochemical evidences. Vet Res Forum. 2017;8(2):97-104.
14.Ramadan MF, Al-Ghamdi A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. J Funct Foods. 2012;4(1):39-52.
15.Khazaei M, Ansarian A, Ghanbari E. New findings on biological actions and clinical applications of royal jelly: a review. J Diet Suppl. 2017;13:1-19.
16.Arzi A, Houshmand G, Goudarzi M, Khadem Haghighian H, Rashidi Nooshabadi M. Comparison of the analgesic effects of royal jelly with morphine and aspirin in rats using the formalin. J Babol Univ Med Sci. 2015;17(2):50-6.[In Persian].
17.Anbara H, Shahrooz R, Malekinejad H, Saadati S. Protective effects of royal jelly and vitamin c against experimental hemolytic anemia on sex hormones and histochemical testicle tissue histochemistry of adult mice. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci. 2016;23(12):1140-54. [In Persian]
18.Yang A, Zhou M, Zhang L, Xie G, Chen H, Liu Z, et al. Influence of royal jelly on the reproductive function of puberty male rats. Food Chem Toxicol. 2012;50(6):1834-40.
19.Babaei M, Najafi G, Shalizar Jalali A, Behfar M. Effects of unilateral iatrogenic vas deferens trauma on fertility: an experimental in vitro fertilization mice model study. Bull Emerg Trauma. 2015;3(4):122-7.
20.Ghanbari E, Khazaei M, Yousefzaei F. The restorative effect of prosopis farcta on fertility parameters and antioxidant status in diabetic rats. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(5):53-60. [In Persian]
21.Oakberg EF. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. Am J Anat. 1956;99(3):391-413.
22.Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. Hormones.1970;1(1):2-25.

23.Humason GL. Animal tissue techniques. San Francisco: WH Freeman.1962.
24.Oyeyipo IP, Raji Y, Emikpe BO, Bolarinwa AF. Effects of oral administration of nicotine on organ weight, serum testosterone level and testicular histology in adult male rats. Niger J Physiol Sci. 2010;25(1):81-6.
25.Guan G, Kramer SF, Bellinger LL, Wellman PJ, Kramer PR. Intermittent nicotine administration modulates food intake in rats by acting on nicotine receptors localized to the brainstem. Life Sci. 2004;74(22):2725-37.
26.Oyeyipo IP, Raji Y, Emikpe BO, Bolarinwa AF. Effects of nicotine on sperm characteristics and fertility profile in adult male rats: a possible role of cessation. J Reprod Infertil. 2011;12(3):201-7.
27.Oyeyipo IP, Maartens PJ, Plessis SS. In vitro effects of nicotine on human spermatozoa. Andrologia. 2014;46(8):887-92.
28.Kim KH, Joo KJ, Park HJ, Kwon CH, Jang MH, Kim CJ. Nicotine induces apoptosis in TM3 mouse Leydig cells. Fertil Steril. 2005;83(1):1093-9.
29.La Maestra S, De Flora S, Micale RT. Effect of cigarette smoke on DNA damage, oxidative stress, and morphological alterations in mouse testis and spermatozoa. Int J Hyg Environ Health. 2015;218(1):117-22.
30.Seema P, Swathy SS, Indira M. Protective effect of selenium on nicotine-induced testicular toxicity in rats. Biol. Biol Trace Elem Res. 2007;120(1-3):212-8.
31.Audi SS, Abraham ME, Borker AS. Effect of cigarette smoke on body weight, food intake and reproductive organs in adult albino rats. Indian J Exp Biol. 2006;44(7):562.
32.Farooqi I, O'Rahilly S. Monogenic human obesity syndromes. Recent Prog Horm Res. 2004;59:409-24.
33.Rato L, Alves MG, Socorro S, Duarte AI, Cavaco JE, Oliveira PF. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. Nat Rev Urol. 2012;9(6):330-8.
34.Binsawad HAS, Hanadi AHM, Kelany, Fatma M, Hanan A, Salah A. The possible protective role of antioxidants (selenium, vitamin E) in reducing smoking effects on testes of albino rats. Ass Univ Bull Environ Res. 2011;14(1):61-76.
35.Amirshahi T, Najafi G, Nejati V. Protective effect of royal jelly on fertility and biochemical parameters in bleomycin-induced male rats. Iran J Reprod Med. 2014;12(3):209-16. [In Persian]
36. Najafi G, Nejati V, Jalali AS, Zahmatkesh E. Protective role of royal jelly in oxymetholone-induced oxidative injury in mouse testis. Iran J Toxicol. 2014;8(25):1073-80. [In Persian]
37.Ghanbari E, Nejati V, Khazaei M. Antioxidant and protective effects of royal jelly on histopathological changes in testis of diabetic rats. Int J Reprod Biomed. 2016;14(8):519-26.