

بررسی اثر تجویز عسل و ویتامین E بر میزان آپوپتوز القاء شده توسط آلودگی صوتی در بیضه‌ی موش صحرایی

اصغر رجب‌زاده¹، قاسم ساکی^{2*}، مسعود حمادی³، علی خدادادی⁴، علیرضا سرکاکی⁵

چکیده

زمینه: آلودگی صوتی باعث افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های ژرمینال بیضه می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر تجویز عسل و ویتامین E بر روند آپوپتوز در سلول‌های ژرمینال بیضه می‌باشد.

روش: در این مطالعه ۲۴ موش صحرایی نر از نژاد ویستار به‌طور کاملاً تصادفی به ۴ گروه: ۱) (عسل+صوت)؛ ۲) (ویتامین E+صوت)؛ ۳) (صوت) و گروه ۴) (کنترل) تقسیم شدند. در گروه‌های ۱، ۲ و ۳ موش‌ها تحت تأثیر صوت قرار گرفتند. بعد از ۵۰ روز بیضه‌ی موش‌ها استخراج شده و با DNase I؛ کلاژناز تیپ IV و تریپسین EDTA هضم شده سپس سوسپانسیون سلولی حاصل جهت بررسی میزان Viability و آپوپتوز با استفاده از کیت تانل مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: در این مطالعه مشاهده شد که استرس صوتی باعث افزایش روند آپوپتوز در بیضه می‌شود، تعداد سلول‌های زنده در گروهی که تحت تأثیر استرس صوتی بدون تجویز عسل یا ویتامین E بودند، کاهش نشان داد. عسل با میانگین ۱/۸۹ درصد ($P=0.000$) و ویتامین E با میانگین ۳/۴۲ نسبت به گروه صوت ($P=0.000$)، درصد میزان آپوپتوز را کاهش دادند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه مشخص گردید که عسل و ویتامین E تأثیر آلودگی صوتی را با کاهش در میزان آپوپتوز در سلول‌های ژرمینال بیضه، خنثی کردند و با افزایش در تعداد سلول‌های زنده، روند اسپرماتوژنز را در موش صحرایی اصلاح نمودند.

واژگان کلیدی: آلودگی صوتی، آپوپتوز، عسل، ویتامین E، سلول‌های ژرمینال.

۱- دانشجوی کارشناس ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، کمیته تحقیقاتی دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، ایران.
تلفن: ۰۹۱۲۳۸۶۶۹۸۹

۲- دانشیار گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، ایران.
تلفن و پست الکترونیک: ۰۹۱۶۳۱۳۴۳۶۱
ghasemsaki@yahoo.com

۳- استادیار گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات باروری و ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، ایران.
تلفن و پست الکترونیک: ۰۹۱۶۳۱۳۴۳۶۱

۴- استادیار گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، ایران.
تلفن و پست الکترونیک: ۰۹۱۶۳۱۳۴۳۶۱

۵- استاد گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، ایران.
تلفن و پست الکترونیک: ۰۶۱۱-۳۷۳۸۰۷۳
sarkaki_a@yahoo.com

* نویسنده‌ی مسؤل:

قاسم ساکی؛ ایران، اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، مرکز تحقیقات فیزیولوژی.
تلفن: ۰۶۱۱-۳۷۳۸۰۷۳

Email: ghasemsaki@yahoo.com

تاریخ پذیرش: 91/5/22

تاریخ دریافت: 91/1/19

مقدمه

غشای میتوکندری در این سلول‌ها شده و روند آپوتوزیس را القاء می‌کند. در پی این القاء آپوتوزیس در سلول‌های سرطانی باعث کاهش تکثیر این سلول‌ها به طور غیر طبیعی می‌شود. با روش فلوسایتومتری مشخص گشته که عسل میزان آپوتوزیس را در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال افزایش می‌دهد (۲۰).

ویتامین E آنتی‌اکسیدان دیگری است که در غشای سلولی وجود دارد این ویتامین پراکسید هیدروژن را خنثی کرده و از غشای سلول در برابر پراکسیداسیون محافظت می‌کند (۲۱). α -Tocopherol فرمی از ویتامین E است که بالاترین فعالیت بیولوژیکی دارد و فراوانترین شکل آن در بدن است. اگرچه در فرآیند جذب همه‌ی هومولوگ‌های توکوفرول یکسان است ولی فرم آلفا به طور غالب در خون و بافت یافت می‌شود (۲۲). ویتامین E تأثیر محافظتی بر روی عملکرد بیضه و قدرت باروری را داراست و تجویز خوراکی آن باعث بهبود عملکرد اسپرم می‌شود (۲۳ و ۲۲). ویتامین E همچنین پراکسیداسیون لپیدی (LPO) را کاهش می‌دهد و جنبش و قدرت بارورسازی را در شرایط استرس اکسیداتیو اصلاح می‌کند (۲۴). حال با توجه به اینکه آلودگی صوتی میزان تولید استرس‌های اکسیداتیو را افزایش و از طرفی عسل ویتامین E به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند، تصمیم گرفته شد تا به موش‌های تحت تأثیر صوت قرار گرفته عسل و ویتامین E تجویز و اثرات این دو آنتی‌اکسیدان بر میزان آپوتوز سلول‌های ژرمینال بیضه مورد مطالعه قرار گیرد.

روش

روش تهیه حیوانات

۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ با وزن 250 ± 20 گرم از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی اهواز خریداری شدند. موش‌ها کاملاً به طور تصادفی به ۴

استرس محیطی از جمله آلودگی صوتی یکی از مشکلات عمده‌ی جامعه‌ی امروزی است که روند آپوتوز را در سلول‌های ژرمینال بیضه افزایش می‌دهد (۱-۴). پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و ROS فاکتورهایی دیگر است که به‌عنوان عوامل تولیدی رادیکال آزاد، باعث آپوتوز در سلول‌های رده‌ی اسپرماتوگونی می‌شود و توانایی بارورسازی اسپرم را کاهش و درصد اسپرم‌های مرده را افزایش می‌دهد (۵-۷). در بسیاری از سلول‌ها از جمله اسپرم‌ها استرس اکسیداتیو و هیپوکسی باعث روند صعودی آپوتوز و مرگ سلولی می‌شود (۸ و ۹).

در کنار این مشکلات آنتی‌اکسیدان‌ها با حذف رادیکال‌های آزاد در سلول‌های صدمه دیده که باعث تخریب آنزیم‌های سلولی و تغییرات مولکولی DNA و ناباروری می‌شود، از بروز عوامل ناخواسته در سیستم تناسلی مردانه جلوگیری می‌کند (۱۰ و ۱۱). عسل یک آنتی‌اکسیدان است و در درمان، از قدیم مورد توجه بسیاری از طبیبان بوده است. ابن سینا در کتاب خود "قانون پزشکی" از عسل در درمان بیماری‌های مختلف و حفظ سلامت بدن، به‌علت داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌میکروبیالی نام برده است (۱۲ و ۱۳). عسل غنی از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی از جمله: کاتالاز، اسید آسکوربیک، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها می‌باشد (۱۴-۱۶) که در مقابل عوامل اکسیدکننده مانع شده و از ترکیب آنها با اسیدهای چرب غیر اشباع جلوگیری می‌کند (۱۴) و مانع اکسیداسیون لیپوپروتئین‌ها می‌شود (۱۷). عسل غنی از فروکتوز و گلوکز، مواد معدنی مانند: منیزیم، پتاسیم، کلسیم، سدیم کلراید، سولفور، آهن و فسفات، ویتامین-های C, B1, B2, B3, B5, B6 می‌باشد (۱۸). عسل روی چندین پارامتر اسپرم تأثیر مثبت دارد. به‌طور چشم‌گیری تعداد اسپرم‌های نرمال را افزایش و اسپرم‌های غیرنرمال را کاهش می‌دهد (۱۹). عسل Tualang در سلول‌های سرطانی گردن و پستان باعث منقطع کردن

عسل از یکی از مراکز زنبورداری در ارومیه (ایران) خریداری شد و به صورت محلول ۵ درصد از راه آب آشامیدنی به موش‌ها داده شد. ویتامین E از محصولات ایران دارو بود.

نمونه‌ی کیت تانل استفاده شده: از شرکت بهسامان ایده ساخت کشور آلمان خریداری شد.

آنالیز آماری

اعداد و اطلاعات با استفاده از نسخه‌ی SPSS ۱۲ انجام گرفت. برای این منظور از آنالیز واریانس استفاده شد. آزمون را در سطح ۹۵ درصد انجام داده و در صورت معنادار بودن آزمون، از آزمون Tukey جهت مقایسه دو به دو در بین گروه‌ها استفاده شد. گروه‌هایی که با هم اختلاف معناداری دارند با سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ مشخص شده‌اند.

نتایج

در گروه کنترل که در شرایط طبیعی بود، میزان سلول‌های آپوپتیک با میانگین $0/9 \pm 0/1$ درصد، میزان سلول‌های زنده با میانگین $0/98.41 \pm 0/06$ درصد و میزان سلول‌های نکروز شده با میانگین $0/24 \pm 0/01$ درصد توسط دستگاه فلوسایتمتری و با استفاده از کیت تانل ثبت شد. این متغیرها در گروه عسل به ترتیب با میانگین $1/89 \pm 0/7$ درصد، $0/3 \pm 0/03$ درصد، $97/10 \pm 0/03$ درصد، $0/26 \pm 0/01$ درصد اندازه‌گیری شد. میانگین متغیرها در گروه ویتامین E به ترتیب: $0/43 \pm 0/08$ درصد، $3/42 \pm 0/06$ درصد، $195/56 \pm 0/07$ درصد، $0/7$ درصد بود. در گروه Noise این مقادیر به ترتیب: $9/88 \pm 0/3$ درصد، $89/31 \pm 0/5$ درصد و $0/611 \pm 0/01$ درصد اندازه‌گیری شد. طبق کار آماری میزان سلول‌های آپوپتیک مابین هر چهار گروه با $P=0.000$ دارای اختلاف معناداری بودند (نمودار ۱). به طوری که در گروه ۳ این اختلاف خیلی قابل چشم‌گیر بود. مابین گروه ۱ و ۴ اختلاف نسبت به گروه‌های ۲ و ۳ بارز نبود. میزان سلول‌های زنده هم مابین گروه‌ها با $p=0.000$ اختلاف معنادار را نشان می‌داد. این اختلاف مابین گروه ۳ با گروه‌های

گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه‌های ۱ تا ۳ روزانه و به مدت ۵۰ روز در معرض $90-130$ dB صوت با فرکانس $300-350$ HZ از ۷ عصر تا ۷ صبح قرار گرفتند (۲۶).

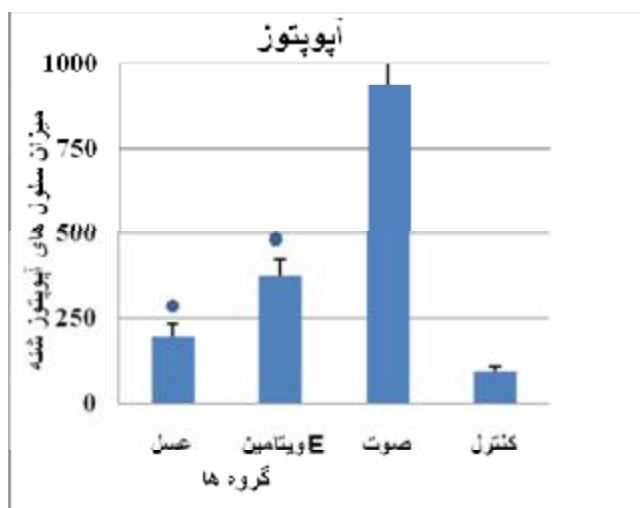
گروه ۱ (تحت تأثیر صوت بودند و محلول ۵ درصد عسل را به صورت گاوآژ دریافت می‌کردند) (۲۷)، گروه ۲ (تحت تأثیر صوت بودند و ویتامین E (۷۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) را به صورت گاوآژ دریافت می‌کردند) (۲۳)، و گروه ۳ (تحت تأثیر صوت بودند و هیچ ماده‌ای دریافت نکرد). گروه ۴ (کنترل) در شرایط طبیعی و بدون هیچ گونه استرس قرار گرفته بود.

پس از ۵۰ روز که معادل دوره‌ی اسپرماتوژنز موش رات می‌باشد، برای بررسی میزان آپوپتوز، بیضه‌ی موش‌های هر ۴ گروه جدا شده و در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین قرار داده شدند. بعد از جداسازی کپسول بیضه در زیر میکروسکوپ استریو، لوله‌های سمینی فروس را در داخل لوله‌ی حاوی DMEM، کلاژناز تیپ IV و DNaseI قرار داده شد. در مراحل بعدی trypsin جهت جداسازی سلول‌ها به محلول اضافه شد. بعد از جدا شدن سلول‌ها، فعالیت trypsin با افزودن FBS ۱۰-۱۲ درصد متوقف شد. تعداد سلول‌ها در محلول PBS شمارش شده و پارافرمالدهید یک درصد به سوسپانسیون سلولی اضافه گردید (شکل ۵). سلول‌ها را در سانتیفریوژ قرار داده تا رسوب سلولی صورت بگیرد. سلول‌های هر تیوب را با بافر شستشو، محلول DNA-Labeling حل کرده و سانتیفریوژ شدند. سلول‌ها در محلول DNA-Labeling به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. بعد از هر مرحله مایع‌رویی استخراج می‌شدند. پلت‌های سلولی را در محلول آنتی‌بادی آماده شده حل کرده و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه می‌شدند. در نهایت بافر رنگ‌آمیزی پروپیدیوم یدید/RNaseA به هر نمونه اضافه شده و نمونه‌ها جهت آنالیز میزان آپوپتوز با کیت تانل، فلوسایتمتری شدند (۲۸ و ۲۹).

نمونه‌ی عسل و ویتامین E

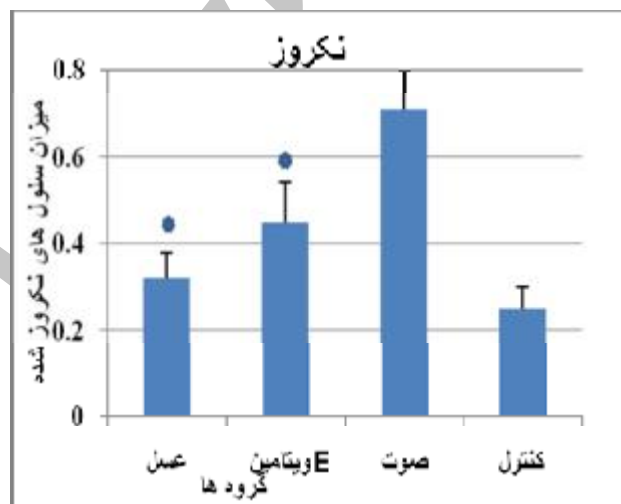
شایان ذکر است که عسل نسبت به ویتامین E، تعداد سلول‌های زنده را با اختلاف معناداری افزایش داد. ولی میزان سلول‌های نکروز شده بین این دو آنتی‌اکسیدان اختلاف معناداری نداشت.

۱ و ۲ و ۴ خیلی بارز بود (نمودار ۲). میزان سلول‌های نکروز شده نیز با $P=0.000$ این اختلاف را مابین گروه‌ها نشان داد. مابین گروه ۱ و ۲ و ۴ اختلاف معنادار نبود (نمودار ۳). در حالی که گروه ۳ نسبت به تمام گروه‌ها با سطح معنادار کمتر از ۰/۰۵ را با اختلاف بالا نشان داد.



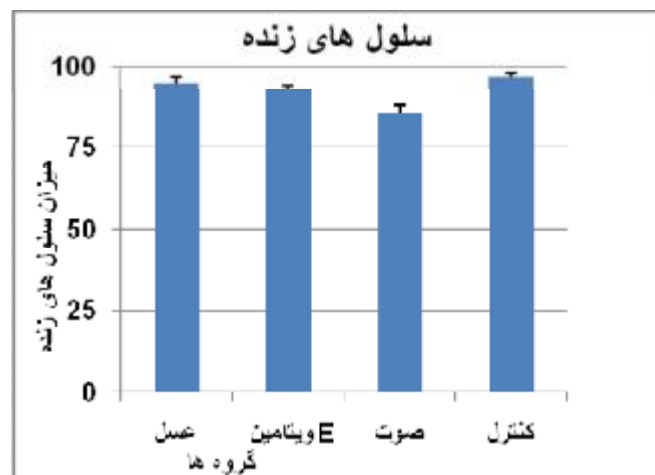
نمودار ۱: میزان سلول‌های آپویتوز شده در ۴ گروه مورد مطالعه.

* اختلاف معنادار ($p < 0.001$) بین دو گروه دریافت‌کننده‌ی عسل و ویتامین با گروه تحت صوت را نشان می‌دهد.

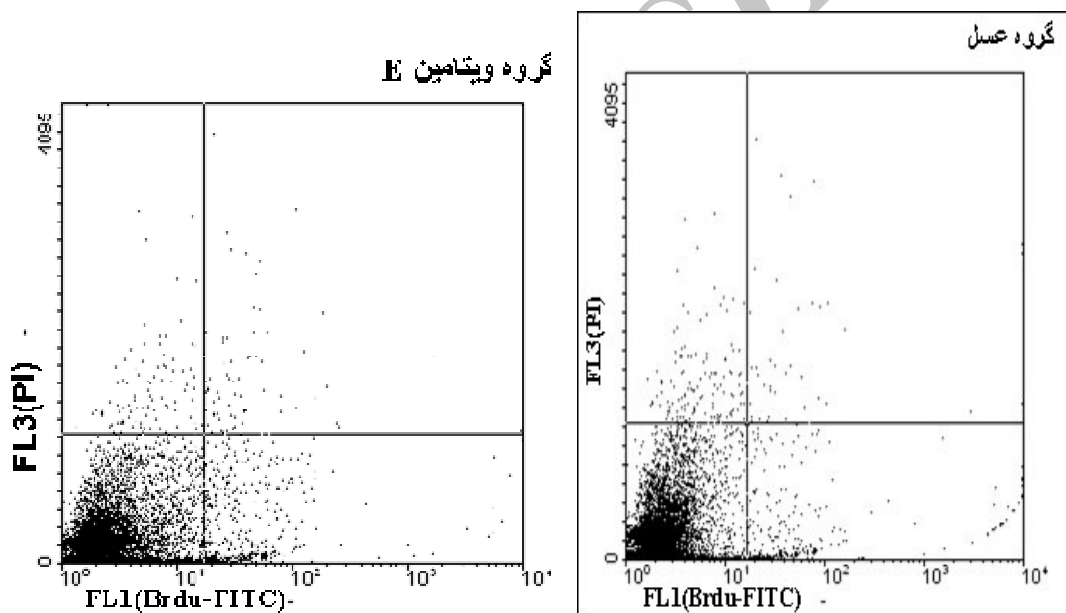


نمودار ۲: میزان سلول‌های نکروز شده در ۴ گروه مورد.

* اختلاف معنادار ($p < 0.001$) بین دو گروه دریافت‌کننده‌ی عسل و ویتامین با گروه تحت صوت را نشان می‌دهد.



نمودار 3: میزان سلول های زنده در 4 گروه مورد مطالعه (آزمون Anova)



شکل 1: نتایج آنالیز فلوسیتومتری. درصد سلول های زنده، آپوپتوزی و نکروز به وسیله **FL1 Dot Plot** (در محور X) و **FL3** (در محور Y) مشخص شدند. در آنالیز فلوسیتومتری هر گروه مربع های چپ پایین، راست پایین و راست بالایی به ترتیب درصد سلول-های زنده، آپوپتوزی و نکروز را نشان می دهند.

بحث

ژرمینال بررسی کرده مطابقت دارد. او نشان داد اگر موش ها ۷ روز و به مدت ۲ ساعت در هر روز تحت تأثیر استرس قرار بگیرند، میزان آپوپتوز در سلول های ژرمینال بیضه افزایش نشان خواهد داد (۳). از طرفی تحقیقات

در این مطالعه مشاهده گردید که آلودگی صوتی میزان آپوپتوز را در سلول های ژرمینال بیضه افزایش می دهد. این نتیجه با عملکرد Hiroshi Yazawa که تأثیر استرس عدم تحرک را بر میزان آپوپتوز در سلول های

درصد بروز آپوپتوز به طور منفی با قدرت حرکت و مورفولوژی اسپرم و به طور مثبت با نقص در دم اسپرم در ارتباط است (۴۳ و ۴۴). نشان داده شده که مارکرهای آپوپتوز در اسپرم‌هایی با حرکت پایین نسبت به اسپرم-هایی با توان حرکتی بالا، افزایش داشته است (۴۵). در این مطالعه هم مشاهده شد که استرس صوتی که باعث افزایش روند آپوپتوز در بیضه می‌شود، تعداد سلول‌های زنده را در گروهی که استرس صوتی بدون مصرف آنتی-اکسیدان داشتند، کاهش می‌داد. همین‌طور مشاهده گردید که تعداد سلول‌های نکروز شده در گروه صوت نسبت به گروه‌های دیگر افزایش داشت. بنابراین می‌توان گفت که آلودگی صوتی باعث تخریب در سلول‌های ژرمینال بیضه-ی موش *Rat* گشته و آپوپتوز و نکروز را در جمعیت سلولی القاء می‌کند. ولی از طرفی در این مطالعه نشان داده شد که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند عسل و ویتامین E میزان بروز آپوپتوز را در گروهی از موش‌ها که در معرض آلودگی صوتی قرار گرفته‌اند به‌طور قابل توجهی کاهش داده و شانس زنده ماندن سلول‌ها برای ادامه‌ی مسیر تکاملی را افزایش می‌دهد. عسل، تأثیر منفی استرس صوتی را بر روی سلول‌های ژرمینال با افزایش در تعداد سلول‌های زنده و کاهش در سلول‌های مرده، ختشی کرد. همان‌طور که در بالا گفته شد، کاهش سطح سرمی تستوسترون و یا تغییر در جریان گنادوتروپین‌ها، سلول‌ها را به سمت آپوپتوز سوق می‌دهد. پس می‌توان این‌گونه پنداشت که آلودگی صوتی سطح سرمی تستوسترون و گنادوتروپین‌ها را دچار تغییراتی می‌کند که سلول‌ها به سمت آپوپتوز و نکروز سوق داده می‌شوند. ولی در کنار این گفته‌ها در بسیاری از مطالعات بیان شده که درمان با عسل روند اسپرماتوژنز را بدون اینکه تأثیری در جریان این هورمون‌ها داشته باشد، افزایش می‌دهد (۲۷) یا در مطالعه‌ی دیگری که بر روی تأثیرات منفی سیگار بر روند هورمون‌های جنسی کار شده بود، نشان داده شد که درمان با عسل در برابر اثر منفی سیگار تغییراتی در بیان

دیگری در این زمینه صورت گرفته، که این نتایج را در مطالعه‌ی ما تأیید می‌کند (۲۱). در بیضه‌ها، آپوپتوز محدود به جمعیت سلول‌های ژرمینال می‌شود و از بلوغ سلول‌های دارای تکامل ناقص جلوگیری می‌کند (۳۰). غیبت فاکتورهای ضروری در سیکل اسپرماتوژنیک مانند: هورمون‌ها، فاکتورهای رشد و سیتوکینز، سلول‌ها را به سمت آپوپتوزیس سوق می‌دهد (۳۰). عملکرد اصلی آپوپتوز در بیضه، کمک به نگهداری هوموستاز بافت در حین اسپرماتوژنز است (۳۱). ولی در کنار این مسأله آپوپتوز غیرطبیعی بر عملکرد سیستم تناسلی مردانه تأثیر منفی دارد. فعالیت آپوپتوز وابسته به بیان پروتئین‌هایی مانند کاسپازها و *Apaf-1* و همین‌طور پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوزیس مانند *Bcl-2* دارد. این پروتئین‌ها همراه با *P53* و *NF-KB* و رسپتورهای مرگ نقش مهمی در روند آپوپتوز در انسان دارند (۳۲-۳۴). مطالعات بی‌شماری نشانگر ارتباط بین مارکرهای آپوپتوز و ناباروری در مرد را نشان می‌دهد (۳۵-۳۹). از طرفی در مطالعاتی که بر روی هورمون‌ها و آپوپتوز صورت گرفته است، بیان شده که توقف یا کاهش در تولید تستوسترون (به‌علت توقف در بیان گنادوتروپین‌ها) باعث القای آپوپتوز در سلول‌های ژرمینال بیضه می‌شود (۳۰ و ۴۰ و ۴۱). بنابراین هر فاکتوری که باعث تخریب سلول‌های لایدیگ شود می‌تواند تستوسترون را متوقف و یا کاهش دهد و پیامد آن القای روند آپوپتوزیس در بیضه شود. کاندراالخا (*Chandralekha*) و همکارانش هم به این نتیجه در سال ۲۰۰۷ رسیدند. آنها مشاهده کردند که اگر موش‌های رات در معرض آلودگی صوتی با شدت ۱۰۰ دسی‌بل قرار بگیرند، کاهش چشم‌گیری در سطح سرمی تستوسترون ایجاد می‌شود. ولی میزان بروز آپوپتوز را بررسی نکردند (۴۲). همین‌طور تغییرات ساختاری در بیضه به دنبال آلودگی با صوت که موش‌ها به مدت ۶۰-۹۰ روز در معرض آن قرار گرفته بودند، نیز گزارش شده است (۴۲).

ها، سلول‌های بیضه جهت زنده ماندن و انرژی لازم جهت تکامل را از سلول‌های سرتولی دریافت می‌کنند. ماهانیم (Mahaneem) و همکارانش گزارش کردند که اگر دوز مناسبی از عسل به موش‌ها تزریق شود، باعث افزایش در تعداد اسپرم‌ها شده و روند اسپرماتوژنز را تسریع می‌بخشد (۴۷).

سایتی (Siti) هم در کار خود مشاهده نمود که عسل تعداد اسپرم‌ها را در موش‌های رات افزایش می‌دهد (۱۹). ناسیم (Naseem) در کار خود اثر ویتامین E را بر روی پارمترهای اسپرم اندازه‌گیری نمود و بیان کرد که ویتامین E باعث افزایش غلظت اسپرم‌ها می‌شود (۲۵). آکاریا (Acharya) و همکارانش نیز در مطالعه‌ی خود این یافته را تأیید کردند (۴۸). بنابراین اینکه عسل و ویتامین E تعداد سلول‌های زنده و سالم را افزایش می‌دهند در تحقیقات زیادی به اثبات رسیده است. در این مطالعه هم تأییدیه تحقیقات فوق به طریق مثبتی نشان داده شد و این افزایش در تعداد سلول‌های اسپرماتوژنز، مبنی برداشتن تأثیر مثبت این آنتی‌اکسیدان‌ها بوده است و این نکته‌ی مثبتی در جهت مقابله با مشکلات ناباروری در مردان که به‌علت بروز آپوپتوز در سلول‌های ژرمینال است، به حساب می‌آید و در نهایت با توجه به یافته‌های به دست آمده در این بررسی استرس صوتی تأثیر منفی بر باروری موش صحرائی نر دارد. پیشنهاد می‌شود که این بررسی بر روی مردانی که در مواجهه‌ی ناخواسته و اجباری با آلودگی صوتی هستند (مانند کارگران کارخانه‌ها، ساکنان مناطق نزدیک به فرودگاه و...) نیز انجام شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد شماره‌ی (۳۸۶/الف) استخراج شده است. از معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه جندی‌شاپور به خاطر تأمین مالی این پایان‌نامه تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

تستوسترون و گنادوتروپین‌ها ایجاد نکرد (۴۶). اما از طرف دیگر نشان داده شده که عسل در سلول‌های سرطانی با منقطع کردن غشای میتوکندری در این سلول‌ها، روند آپوپتوزیس را القاء می‌کند (۲۰). پس طبق مطالعات انجام شده در این زمینه، عسل و ویتامین E در آپوپتوز سلول‌های ژرمینال بافت‌های بدن تأثیر مثبت دارد ولی اینکه در بیضه چگونه باعث کاهش این روند در سلول‌های رده‌ی اسپرماتوژنز می‌شود شاید یکی از مجهولاتی باشد که بهتر است با کار بیشتر در این زمینه فاکتورهای مؤثر در آن مشخص شود. می‌دانیم هر فاکتوری که بر عملکرد و توانایی سلول‌های ژرمینال و سلول‌های سرتولی نقص ایجاد کند، ممکن است مستقیماً بر روند اسپرماتوژنز مؤثر باشد. آپوپتوز در حالت نرمال در ساختار بیضه تعادل را بین جمعیت سلولی ژرمینال و سرتولی کنترل می‌کند (۳۰). سلول‌های سرتولی در حذف مواد اضافی بعد از تکامل کامل سلول‌های اسپرم نقش اساسی دارد. به‌طور معمول هورمون لوتهینی‌کننده، در بیضه‌ها باعث افزایش در سطح تستوسترون می‌شود و در کنار آن هورمون محرکه فولیکولی ترشح پروتئین متصل شونده به آندروژن‌ها به‌وسیله‌ی سلول‌های سرتولی را کنترل می‌کند (۴۲). بنابراین با این مقدمه اگر فرض را بر این بگیریم که هورمون‌ها با تأثیر بر سلول‌های سرتولی روند آپوپتوز را تحت تأثیر می‌گذارند، بنابراین عسل و ویتامین E احتمالاً با ایجاد تغییراتی در جریان این هورمون‌ها و سلول‌های سرتولی، بر روند آپوپتوز در سلول‌ها تأثیر گذاشته و آن را کاهش می‌دهند. اگر فرض دوم را بر این بگیریم که عسل و ویتامین E با بالا بردن سطح خون‌رسانی به سلول‌های سرتولی تأثیر مثبت بر تغذیه‌ی سلول‌های ژرمینال داشته باشند، پس با بالا رفتن سطح حمایتی از سلول‌های سرتولی توسط آنتی‌اکسیدان-

References

- 1-Pellegrini A, Soldani P, Gesi, M, Lenzi P, Natale G, Martini F, et al. Diazepam reduces ultrastructural changes induced by noise stress in rat adrenal gland. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1998;30(3):385-91.
- 2-Srivastava RK, Taylor MF, Mann DR. Effect of immobilization stress on plasma luteinizing hormone, testosterone, and corticosterone concentrations and on 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the testes of adult rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993;204(2):231-5.
- 3-Yazawa H, Sasagawa I, Ishigooka M, Nakada T. The effect of immobilization stress on testicular germ cell apoptosis in rats. *Hum Reprod* 1999;14:1806-10.
- 4-Chandralekha G. The effect of noise induced stress on the male reproductive endocrine glands of Albino rat. Ph.D thesis, 2002. Dr. M.G.R. Medical University and Research Chennai.
- 5-Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 2003;80(3):531-535.
- 6-Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996; 48(6):835-50.
- 7-Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 2003;80(3):531-5.
- 8-Li D, Yang B, Mehta JL. Tumor necrosis factor-alpha enhances hypoxia-reoxygenation-mediated apoptosis in cultured human coronary artery endothelial cells: critical role of protein kinase C. *Cardiovasc Res* 1999;42(3):805-13.
- 9-Lysiak JJ, Zheng S, Woodsen R, Turner TT. Caspase-9-dependent pathway to murine germ cell apoptosis: medication by oxidative stress, BAX, and caspase 2. *Cell Tissue Res* 2007;328(2):411-9.
- 10-Bauche F, Fouchard MH, Jegou B. Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Lett* 1994;349(3):392-6.
- 11-Gu W, Hecht NB. Developmental expression of glutathione peroxidase, catalase, and manganese superoxide ismutase mRNA during spermatogenesis in the mouse. *J Androl* 1996;17(3): 256-62.
- 12-Kamaruddin MY. Honey: A healing for mankind throughout the ages. *Fountain*;1993;1(3):4-6.
- 13-Aljady AM, Kamaruddin MY, Jamal AM, Mohd Yassim MY. Biochemical study on the efficacy of Malaysian honey on inflicted wounds: An animal model. *Med J Islamic Acad Sci* 2000;13(3):125-32.
- 14- Pérez E, Rodríguez-Malaver AJ, Vit P.. Antioxidant capacity of Venezuelan honey in wistar rat homogenates. *J Med Food* 2006;9(4):510-6.
- 15-Khalil MI, Sulaiman SA, Boukraa L. Antioxidant properties of honey and its Role in preventing health disorder. *Open Nutraceuticals J* 2010;3:6-16.
- 16-Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. Honey for nutrition and health: a review. *J Am Coll Nutr* 2008;27(6):677-89.
- 17-Gill-Sharma MK, D'Souza S, Parte P, Balasinar N, Choudhuri J, Majramkar DD, et al. Effect of oral tamoxifen on semen characteristics and serum hormone profile in male bonnet monkeys. *Contraception*. 2003;67(5):409-13.
- 18-Estevinho L, Pereira AP, Moreira L, Dias LG, Pereira E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food Chem Toxicol* 2008;46(12):3774-9.
- 19-Syazana NS, Hashida NH, Majid AM, Durriyah Sharifah HA , Kamaruddin MY. Effects of Gelam Honey on sperm Quality and Testis of Rat. *Sains Malaysiana* 2011;40(11):1243-6.
- 20-Fauzi AN, Norazmi MN, Yaacob NS. Tualang honey induces apoptosis and disrupts the mitochondrial membrane potential of human breast and cervical cancer cell lines. *Food Chem Toxicol* 2011;49(4):871-8.
- 21-Kessopoulou E, Powers HJ, Sharma KK, Pearson MJ, Russell JM, Cooke ID, et al. A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertil Steril* 1995;64(4):825-31.
- 22-Shalaby MA, El zorba HY. Protective Effect of Celery oil, Vitamin E and Their Combination against Testicular Toxicity in male Rats. *Global Veterinaria*. 2010;5(2):122-8.
- 23-Mustafa E, Mehmet C, Kenan G, Mustafa G. Effects of nicotine and vitamin E on glutathione reductase activity in some rat tissues in vivo and in vitro. *Eur J pharmacol* 2007;554(2-3):92-7.
- 24-Yousef MI, Abdallah GA, Kamel KI. Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Anim Reprod Sci* 2003;76(1-2):99-111.
- 25-Naseem M, Goh YM, Hafandi A, Amal NM, Kufli CN, Rajion MA. Effects of vitamin E and soybean oil supplementation on sperm parameters in male Sprague-Dawley rats. *Trop Biomed* 2007;24(2):45-8.
- 26-Karami K, Sarkaki AR. [The effect of noise on fertility outcomes of white rats]. *Sci Med J* 2002;33:45-9. [In Persian]
- 27-Abdul-Ghani AS, Dabdoub N, Muhammad R, Abdul-Ghani R, Qazzaz M. Effect of Palestinian honey on spermatogenesis in rats. *J Med Food* 2008;11(4):799-802.

- 28-Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T. Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. *Hum Reprod* 2003;18(12):2660-7.
- 29-Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Biol Reprod* 1999;60(2):515-21.
- 30-Yazawa H, Sasagawa I, Ishigooka M, Nakada T. Effect of immobilization stress on testicular germ cell apoptosis in rats. *Hum Reprod* 1999;14(7):1806-10.
- 31-Martincic DS, Virant Klun I, Zorn B, Vrtovec HM. Germ cell apoptosis in the human testis. *Pflugers Arch* 2001;442(6 Suppl 1):R159-60.
- 32-Aggarwal A, Misro MM, Maheshwari A, Sehgal N, Nandan D. Adverse effects associated with persistent stimulation of Leydig cells with hCG in vitro. *Mol Reprod Dev* 2009;76(11):1076-83.
- 33-Aycan Z, Ustunsalih-Inan Y, Cetinkaya E, Vidinlisan S, Ornek A. Evaluation of low-dose hCG treatment for cryptorchidism. *Turk J Pediatr* 2006;48(3): 228-31.
- 34-Diemer T, Allen JA, Hales KH, Hales DB. Reactive oxygen disrupts mitochondria in MA-10 tumor Leydig cells and inhibits steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and steroidogenesis. *Endocrinology* 2003;144(7):2882-91.
- 35-Brugnon F, Van Assche E, Verheyen G, Sion B, Boucher D, Pouly JL, et al. Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Hum Reprod* 2006;21(3):685-93.
- 36-Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ Jr, et al. Relationship between ROS production apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 2004;19:129-38.
- 37-Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod Update* 2004;10(1):39-51.
- 38-Taylor SL, Weng SL, Fox P, Duran EH, Morshedi MS, Oehninger S, et al. Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. *Mol Hum Reprod* 2004;10(11):825-34.
- 39-Zedan H, El-Mekhlafi AW, El-Noweihi AM, Abd El-Azim NE, Mostafa T. Soluble Fas and gonadal hormones in infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 2009;91(2):420-4.
- 40-Mylchreest E, Sar M, Wallace DG, Foster PM. Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(n-butyl) phthalate. *Reprod Toxicol* 2002;16(1):19-28.
- 41-Troiano L, Fustini MF, Lovato E, Frasoldati A, Malorni W, Capri M, et al. Apoptosis and spermatogenesis: evidence from an in vivo model of testosterone withdrawal in the adult rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;202(3):1315-21.
- 42- Swami CG, Ramanathan J, Charan Jeganath C. Noise Exposure effect on Testicular histology, morphology and on male steroidogenic hormone. *Malaysian J Med Sci* 2007;14(2):28-35.
- 43- Aziz N, Said T, Paasch U, Agarwal A. The relationship between human sperm apoptosis and morphology, the sperm deformity index. *Human Reprod* 2007;22(5):1413-9.
- 44-Chen Z, Hauser R, Trbovich AM, Shifren JL, Dorer DJ, Godfrey-Bailey L, et al. The relationship between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study. *J Androl* 2006;27(1):112-20
- 45-Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, et al. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 2002;8(11):984-91.
- 46-Asiyah HA, Syazana NS, Hashida NH, Durriyyah Sharifah HA, Kamaruddin MY. Effects of nicotine and Gelam honey on testis parameters and sperm quality of juvenile rats. *Sci Res Essays* 2011;6(26):5471-4.
- 47-Mahanem M, Siti Amrah S, Yatiban MK, Hasnan J. Effect of 'Tualang Honey' on Spermatogenesis in Rats. *Proceedings of 1st International Conference on the Medicinal Uses of Honey (from Hive to Therapy); Malays J Med Sci.* 2007 January; 14(1): 101-127.
- 48-Acharya UR, Mishra M, Patro J, Panda MK. Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. *Reprod Toxicol* 2008;25(1):84-8.

«Original Article»

Evaluation of effect of honey and vitamin E on apoptosis in testes of rat exposed to noise stressAsghar Rajabzadeh¹, Ghasem Saki^{2*}, Masoud Hemadi³, Ali Khodadadi⁴, Ali Reza Sarkaki⁵

1- MS.c Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Student Research Committee, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

2- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Physiology Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Fertility and Infertility Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

4- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Cancer Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

5- Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Physiology Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

*Corresponding Author:

Ghasem Saki; Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Tel: 0611-3738073

E-mail: ghasemsaki@yahoo.com

Abstract

Background: Noise pollution causes of apoptosis in germinal cells of testes. This study investigated the effects of honey and vitamin E administration on the process of apoptosis in cells of the germinal testis of rats exposed to noise stress.

Methods: In this study, 24 male wistar rats randomly grouped as: 1 (honey + noise stress), 2 (vitamin E + noise stress) 3 (noise stress) and group 4 (control) groups. In groups 1, 2 and 3 rats were exposed to noise stress. After 50 days testes of rats were extracted and digested by using DNaseI, collagenase type IV and trypsin- EDTA then viability and apoptosis of the cells in harvested cell suspension evaluated by using the TUNEL kit.

Results: This study showed that the apoptosis was increased and viability decreased in testes of exposed rats to noise stress. By administrated of honey and vitamin E we observed that the apoptosis rate significantly decreased (1.89 % and 3.98% in groups received honey and vitamin respectively). ($p < 0.05$).

Conclusion: This study showed that administration of honey and vitamin E reduced the effect of noise stress and apoptosis in germinal cell and recovered spermatogenesis in rats with increase numbers of live cells.

Keywords: noise stress, apoptosis, honey, vitamin E, germ cells.

► Please cite this paper as:

Rajabzadeh A, Saki G, Hemadi M, Khodadadi A, Sarkaki AR. Evaluation of effect of honey and vitamin E on apoptosis in testes of rat exposed to noise stress. *Jentashapir* 2012;3(4):523-532

Received: 07.04.2012

Accepted: 12.08.2012