

اثر محافظتی ژل رویال بر روی هیستومورفومتری بافت بیضه و روند اسپرماتوژنز در موش‌های صحرایی نر مواجه شده با تنش حرارتی

نوشین مهدیوند^{۱*}، وحید نجاتی^۱، غلامرضا نجفی^۲، علی شالیزار جلالی^۳، فاطمه رحمانی^۱

(۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

(۲) گروه علوم پایه، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۲۶

چکیده

مقدمه: هایپرترمی اسکروتومی به عنوان عامل ناباروری جنس نر شناخته شده است. تنش حرارتی در بیضه حتی برای یک دوره کوتاه می تواند باعث تخریب بافت بیضه و بروز اختلالات در روند اسپرماتوژنز شود. این مطالعه به منظور بررسی اثرات محافظتی ژل رویال بر روی آسیب بیضه و اسپرماتوژنز پس از القاء تنش حرارتی در موش های صحرایی نر انجام گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، ۴۸ رت نر به طور تصادفی به ۸ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه ۱: شاهد، گروه ۲: ژل رویال (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی)، گروه های ۳، ۴ و ۵ به ترتیب تحت تنش حرارتی در دماهای ۴۳، ۳۹ و ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه در روز و گروه های ۶ و ۷ به ترتیب تحت تنش حرارتی در دماهای ۴۳، ۳۹ و ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه در روز به همراه ژل رویال به میزان ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی روزانه دریافت کردند. تنش حرارتی به واسطه غوطه ورسازی اسکروتوم رت ها در حمام آب القاء گردید. پس از ۴۸ روز، موش ها آسان کشی و بیضه های چپ جدا و تثبیت شدند. مقاطع بافتی ۵ میکرومتری بیضه تهیه و با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند.

یافته های پژوهش: نتایج نشان داد که قطر و ارتفاع اپی تلیوم زایای لوله های اسپرم ساز، ضخامت غشای پایه، تعداد سلول های اسپرماتوژنیک و سرتولی و وزن بیضه به میزان قابل توجهی ($P < 0.05$) در گروه های تحت تنش حرارتی نسبت به گروه های شاهد و گروه ژل رویال کاهش یافت. تجویز هم زمان ژل رویال به غیر از گروه تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی گراد+ژل رویال، فراسنجه های فوق را در تمام حیوانات مواجه شده با تنش حرارتی به شکل قابل ملاحظه ای ($P < 0.05$) بهبود بخشید.

بحث و نتیجه گیری: تجویز ژل رویال می تواند از تغییرات بافتی بیضه و کاهش تعداد سلول های اسپرماتوژنیک در شرایط تنش حرارتی بیضه محافظت کند.

واژه های کلیدی: تنش حرارتی، ژل رویال، اسپرماتوژنز، بیضه، موش صحرایی

* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

Email: n_mehdivand@yahoo.com

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

ناباروری یک اختلال پیچیده با جنبه های پزشکی، روانی و اقتصادی قابل توجه است. حدود ۲۰ درصد از زوج ها در عرض یک سال آبستنی را تجربه نمی کنند که ۱۵ درصد از آن ها به درمان های پزشکی اقدام می کنند و کمتر از ۵ درصد این افراد هرگز صاحب فرزند نمی شوند. ناباروری هم مردان و هم زنان را تحت تاثیر قرار می دهد. ۵۰ درصد علل ناباروری در زوج های بدون فرزند، به مردان مربوط می شود (۱).

در این جهان پیشرفته، تنش یک پدیده اجتناب ناپذیر است. موقعیت های تنش زا می تواند به بسیاری از تغییرات فیزیولوژیکی و روانی منجر شود. عوارض جانبی تنش بر دستگاه تولیدمثلی مردان شرح داده شده است و نشان داده شده است که تنش شغلی در انسان می تواند بر غلظت اسپرم، تحرک اسپرم و مورفولوژی آن تاثیر گذارد (۲).

در گونه های مختلف پستانداران درجه حرارت نسبتاً پایین برای روند طبیعی اسپرماتوژنز و باروری اسپرم مورد نیاز است. مطالعات مشخص کرده است که درجه حرارت کیسه بیضه در اغلب پستانداران ۴ تا ۵ درجه سانتی گراد از حرارت داخل محوطه بطنی پایین تر است. اختلال در روند اسپرماتوژنز متعاقب نهمان بیضگی، به دنبال قرار گرفتن بیضه ها در درجه حرارت بالا در محوطه بطنی ایجاد می شود. گزارش شده است که با سرد کردن بیضه ها در داخل محوطه بطنی، اسپرماتوژنز طبیعی حاصل می شود (۳).

آسیب ناشی از گرما در بیضه ها یکی از علل ناباروری در مردان و اغلب پستانداران محسوب می شود. قرار گرفتن بیضه ها در معرض گرما، حتی کوتاه مدت، منجر به توقف اسپرماتوژنز می گردد که مدت زمان بهبودی در آن حدود ۴۰ یا حتی ۶۰ روز طول می کشد. نشان داده شده است که وزن بیضه ها حتی ۶۰ روز پس از یک بار قرار گرفتن در معرض گرما، به مقادیر طبیعی بازنگشته است (۴).

آپوپتوز سلول های زایای بیضه یک مکانیسم مهم در تکامل بیضه و هم چنین از بین رفتن سلول های جنسی در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک است (۵). مطالعات پیشین نشان داده اند که گرما باعث القاء روند

مرگ سلولی در بیضه می شود، به طوری که مرگ اسپرماتوسیت های اولیه و اسپرماتوگونی ها کاملاً مشهود می باشد (۶).

داروهای مختلف با مکانیسم های متفاوت جهت کاهش اثرات سوء تنش حرارتی بر سلول های رده اسپرماتوژنز در بافت بیضه مورد استفاده قرار گرفته اند و در این میان استفاده از آنتی اکسیدانت ها جهت غلبه بر این عوارض بیشتر مد نظر بوده است (۷).

ژل رویال یکی از فرآورده های زنبور عسل می باشد که در معده زنبور کارگر به وسیله هضم ناقص عسل ایجاد می شود. این ماده از غدد زیرحلقی و فکی به منظور تغذیه زنبور ملکه ترشح می شود (۸). ژل رویال، ماده ای ژلاتینی به رنگ سفید شیری است که دارای بوی تند، مزه ای میوه ای و ارزش غذایی فراوان است. این ژل عامل بزرگ تر بودن جثه، قدرت باروری زیاد و طولانی شدن عمر ملکه است (۹). هم چنین، نشان داده شده است که ژل رویال دارای انواع فعالیت های بیولوژیکی در سلول ها و بافت های مختلف بدن است (۱۰). ژل رویال یک محرک کمک کننده به حفظ فعالیت منظم و طبیعی متابولیکی هورمون ها و نیز یک تقویت کننده انرژی زا برای تمام سنین به شمار می رود و در درمان مشکلات از کارافتادگی جنسی مزمن واجد کارایی است (۱۱). تاثیر مثبت ژل رویال بر فراسنجه های اسپرمی و باروری حیوانات در مطالعات پیشین گزارش شده است (۱۲). در مردان فعالیت استروژنی غیرمحیطی ژل رویال می تواند تاثیر منفی استروژن خارجی بر دستگاه تولیدمثلی مردان را مهار کند (۱۳). به همین ترتیب استفاده از ژل رویال ممکن است یک روش موثر برای درمان ناباروری ناشی از آستنواسپرما باشد (۱۴). مطالعات نشان داده است که ژل رویال دارای مزایای درمانی زیادی است با این حال اطلاعات کمی در مورد اثرات ژل رویال بر دستگاه تولیدمثلی مردان در دسترس است (۱۵).

بر این اساس، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات محافظتی ژل رویال بر روی تغییرات هیستومورفومتریکی بافت بیضه و روند اسپرماتوژنز در موش های صحرایی متعاقب القاء تنش حرارتی انجام شد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تعداد ۴۸ موش صحرایی نر با وزن تقریبی 180 ± 20 گرم از خانه حیوانات دانشکده علوم دانشگاه ارومیه تهیه شدند. موش ها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در شرایط دمایی ۲۲-۲۵ درجه سانتی گراد با دسترسی آزاد به آب و غذا در قفس های مخصوص نگهداری شدند. آب آشامیدنی حیوانات در تمام طول آزمایش آب لوله کشی شهری و تغذیه به صورت غذای مخصوص (پلت) بود. در همه مراحل اجرای این پژوهش، قواعد مربوط به اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی (دستورالعمل کمیسیون اروپا 86/609/EEC) رعایت گردید.

متعاقب یک هفته سازگاری با شرایط محیطی، حیوانات به طور مساوی به ۸ گروه ۶ تایی تقسیم شدند:

گروه ۱ به عنوان گروه شاهد سالیان نرمال دریافت کردند، گروه ۲ به عنوان گروه شاهد ژل رویال روزانه ۱۰۰ میلی گرم ژل رویال محلول در سالیان نرمال را به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی دریافت کردند (در گروه های ۱ و ۲ دمای حمام آب ۲۳ درجه سانتی گراد بود)، گروه های ۳، ۴ و ۵ به عنوان گروه های تحت تنش حرارتی به ترتیب در حمام آب گرم با دماهای ۴۳ (دمای بیشینه تنش حرارتی)، ۳۹ (دمای متعادل تنش حرارتی) و ۳۷ درجه سانتی گراد (دمای کنترل)، روزانه به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند (۱۶) و گروه های ۶، ۷ و ۸ به عنوان گروه های درمان نیز به ترتیب در حمام آب گرم با دماهای ۴۳، ۳۹ و ۳۷ درجه سانتی گراد روزانه به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند و روزانه ژل رویال را به میزان ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. طول دوره تیمار در این حیوانات ۴۸ روز در نظر گرفته شد.

ژل رویال مورد استفاده در این مطالعه شهریور ماه سال ۱۳۹۵ از کندوهای زنبورستان های شهرستان ارومیه تهیه شد و در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن آماده گردید (۱۷). در پایان دوره تیمار، همه موش های صحرایی آسان کشی شدند و بیضه سمت چپ بعد از توزین جهت مطالعات بافتی در فرمالین ۱۰

درصد تثبیت شد. پس از طی مراحل پاساژ بافتی، برش هایی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد و با روش پرئودیک-اسید-شیف (PAS) رنگ آمیزی گردید و از نظر بافت شناسی مورد بررسی قرار گرفت.

برای انجام مطالعات هیستومورفومتریک بافت بیضه، از عدسی چشمی مدرج استفاده شد و فراسنجه هایی نظیر قطر لوله های اسپرم ساز، ارتفاع اپی تلیوم زایا و ضخامت غشای پایه به طور تصادفی با درشت نمایی $\times 40$ در گروه های مختلف اندازه گیری و با هم مقایسه گردید.

جهت شمارش سلول های اسپرماتوژنیک و سرتولی در هر گروه تعداد ۱۰ برش به صورت تصادفی انتخاب شد و در هر برش تعداد ۲۰ لوله اسپرم ساز به صورت تصادفی با درشت نمایی $\times 40$ مورد ارزیابی قرار گرفت. هم چنین، برای ارزیابی روند اسپرماتوژنز از شاخص جانسن استفاده شد. برای منظور از مقطع عرضی ۱۰۰ لوله اسپرم ساز در هر حیوان استفاده شد و به هر لوله بر اساس الگوی زیر نمره ۱ تا ۱۰ تعلق گرفت (۱۸).

۱۰: اسپرماتوژنز کامل، تعداد زیادی سر اسپرم در حاشیه حفره میانی گرد و منظم قرار دارند، ۹: تعداد زیادی اسپرم وجود دارد ولی حفره میانی گرد و منظم دیده نمی شود، ۸: تعداد اسپرم خیلی کم است، ۷: اسپرم دیده نمی شود ولی تعداد زیادی اسپرماتید گرد رویت می شود، ۶: تعداد کمی اسپرماتید گرد دیده می شود، ۵: هیچ اسپرم و اسپرماتید گردی دیده نمی شود ولی تعداد زیادی اسپرماتوسیت اولیه مشاهده می شود، ۴: تعداد خیلی کمی اسپرماتوسیت اولیه دیده می شود، ۳: هیچ اسپرماتوسیت اولیه ای دیده نمی شود و فقط اسپرماتوگونی دیده می شود، ۲: هیچ سلول زایایی وجود ندارد و فقط سلول سرتولی دیده می شود، ۱: نه سلول زایا و نه سلول سرتولی دیده می شود و لوله های اسپرم ساز آتروفیک می باشند.

نتایج حاصل از این بررسی با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ و آزمون واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند و سطح معنی داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته های پژوهش

وزن بیضه چپ پس از اتمام دوره تیمار در گروه های تحت تنش حرارتی نسبت به گروه های درمان، شاهد و ژل رویال کاهش معنی داری را نشان داد (جدول شماره ۱).

وزن بدن و بیضه: مطالعه حاضر نشان داد که میانگین وزن بدن حیوانات در پایان مطالعه تفاوت معنی داری را در هیچ یک از گروه ها نشان نمی دهد.

جدول شماره ۱. مقایسه میانگین وزن بدن و بیضه در گروه های مختلف آزمایشی وجود حروف متفاوت در هر ردیف عمودی نشان دهنده تفاوت معنی دار می باشد ($P < 0.05$). نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده اند.

گروه	وزن بدن قبل از دوره تیمار (گرم)	وزن بدن بعد از دوره تیمار (گرم)	وزن بیضه (گرم)	نسبت وزن بیضه به وزن بدن
شاهد	180/65 \pm 16/02 ^a	204/16 \pm 16/47 ^a	1/52 \pm 0/081 ^a	0/7160 \pm 0/10 ^a
ژل رویال	182/46 \pm 11/78 ^a	206/45 \pm 11/99 ^a	1/55 \pm 0/079 ^a	0/7260 \pm 0/04 ^a
33°C	181/34 \pm 17/75 ^a	192/64 \pm 12/52 ^a	0/39 \pm 0/085 ^b	0/1760 \pm 0/17 ^b
39°C	183/08 \pm 14/78 ^a	197/56 \pm 16/96 ^a	1/05 \pm 0/065 ^c	0/4800 \pm 0/08 ^c
37°C	181/80 \pm 13/98 ^a	203/74 \pm 12/00 ^a	1/12 \pm 0/075 ^{c,d}	0/5380 \pm 0/05 ^{c,d}
33°C + ژل رویال	180/85 \pm 12/34 ^a	200/57 \pm 15/01 ^a	0/700 \pm 0/115 ^c	0/3260 \pm 0/02 ^c
39°C + ژل رویال	179/99 \pm 11/55 ^a	202/67 \pm 16/31 ^a	1/35 \pm 0/085 ^{a,d}	0/6300 \pm 0/05 ^{a,d}
37°C + ژل رویال	180/69 \pm 10/86 ^a	207/10 \pm 17/49 ^a	1/44 \pm 0/086 ^a	0/6940 \pm 0/09 ^a

سانتی گراد+ژل رویال رویال نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی داری را نشان نداد. هم چنین، گروه 33 درجه سانتی گراد+ژل رویال در مقایسه با گروه تنش حرارتی 33 درجه سانتی گراد افزایش معنی داری ($P < 0.05$) را در تعداد سلول های اسپرماتوژنیک و سرتولی نشان داده است (جدول شماره ۲).

شمارش سلول های اسپرماتوژنیک و سرتولی: نتایج به دست آمده از شمارش سلول های زایا نشان می دهد که میانگین تعداد سلول های اسپرماتوژنیک، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و سرتولی بین گروه های شاهد و ژل رویال و تنش های حرارتی واجد اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) می باشد. تعداد این سلول ها در گروه های 39 درجه سانتی گراد+ژل رویال و 37 درجه

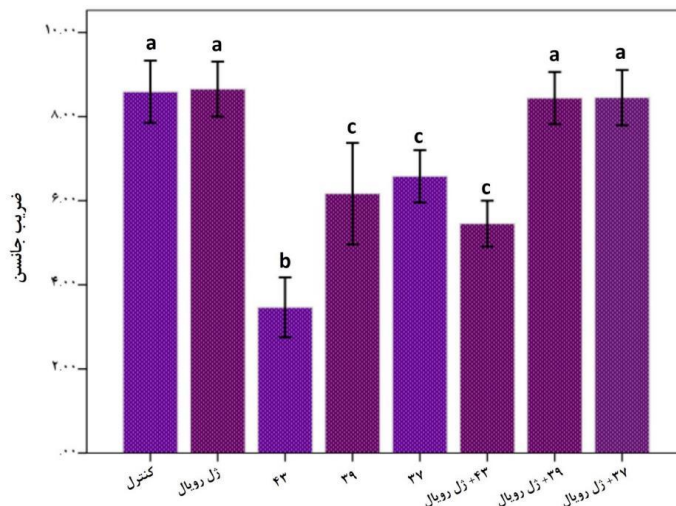
جدول شماره ۲. مقایسه میانگین تعداد سلول های اسپرماتوژنیک و سرتولی در گروه های آزمایشی مختلف

گروه	اسپرماتوژنیک	اسپرماتوسیت	اسپرماتید	سرتولی
شاهد	40/66 \pm 4/58 ^a	52/66 \pm 2/01 ^a	196/44 \pm 7/72 ^a	21/07 \pm 2/28 ^a
ژل رویال	66/01 \pm 43/3 ^a	54/00 \pm 2/68 ^a	199/15 \pm 5/77 ^a	22/06 \pm 1/79 ^a
33°C	19/83 \pm 3/97 ^b	31/16 \pm 2/78 ^b	59/15 \pm 13/73 ^b	9/99 \pm 2/03 ^b
39°C	31/66 \pm 3/72 ^c	42/16 \pm 4/53 ^c	123/16 \pm 11/26 ^c	14/98 \pm 2/76 ^c
37°C	32/66 \pm 3/01 ^{c,d}	43/33 \pm 3/72 ^c	133/12 \pm 7/35 ^c	15/46 \pm 2/75 ^{c,d}
33°C + ژل رویال	27/16 \pm 5/19 ^c	37/83 \pm 2/06 ^c	92/47 \pm 11/29 ^d	14/28 \pm 2/82 ^c
39°C + ژل رویال	39/00 \pm 2/96 ^a	50/33 \pm 2/78 ^a	190/79 \pm 11/29 ^a	19/75 \pm 1/24 ^{a,d}
37°C + ژل رویال	39/66 \pm 2/50 ^a	50/83 \pm 2/71 ^a	192/80 \pm 13/68 ^a	20/72 \pm 2/66 ^a

وجود حروف متفاوت در هر ردیف عمودی نشان دهنده تفاوت معنی دار می باشد ($P < 0.05$). نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده اند.

اختلاف معنی داری مشاهده نشد. به علاوه، این شاخص در گروه 33 درجه سانتی گراد+ژل رویال در مقایسه با گروه تنش حرارتی 33 درجه سانتی گراد افزایش معنی داری ($P < 0.05$) را نشان داد (شکل شماره ۱).

ارزیابی اسپرماتوژنز: در هر سه گروه تحت تنش حرارتی کاهش معنی داری ($P < 0.05$) در ضریب جانسن نسبت به گروه های شاهد و ژل رویال مشاهده شد و بین گروه های 39 درجه سانتی گراد+ژل رویال و 37 درجه سانتی گراد+ژل رویال با گروه های شاهد



شکل شماره ۱. میانگین ضریب جانسن در گروه های آزمایشی مختلف وجود حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار می باشد ($P < 0.05$). نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده اند.

سانتی گراد+ژل رویال نیز نسبت به گروه های شاهد و ژل رویال اختلاف معنی داری را در فراسنجه های فوق نشان ندادند. ارتفاع اپی تلیوم زایا، قطر لوله های اسپرم ساز و هم چنین ضخامت غشای پایه در گروه ۴۳ درجه سانتی گراد+ژل رویال نسبت به گروه تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی گراد افزایش معنی داری ($P < 0.05$) را نشان داد (جدول شماره ۳).

نتایج ارزیابی های مورفومتریک لوله های اسپرم ساز بیضه: متعاقب ارزیابی های مورفومتریک مشخص گردید که ضخامت غشای پایه، ارتفاع اپی تلیوم زایا و قطر لوله های اسپرم ساز در هر سه گروه تنش حرارتی دارای کاهش معنی داری ($P < 0.05$) نسبت به گروه های شاهد و ژل رویال می باشند. گروه های درمان ۳۹ درجه سانتی گراد+ژل رویال و ۳۷ درجه

جدول شماره ۳. مقایسه میانگین فراسنجه های مورفومتریک لوله های اسپرم ساز بیضه در گروه های آزمایشی مختلف ($\times 40$)

گروه	قطر لوله های اسپرم ساز (میکرومتر)	ضخامت اپی تلیوم زایا (میکرومتر)	ضخامت غشای پایه (میکرومتر)
شاهد	۱۱۲/۶۳ \pm ۹/۵۳ ^a	۵۵/۳۰ \pm ۴/۹۲ ^a	۲/۲۸ \pm ۰/۱۴۵ ^a
ژل رویال	۱۱۳/۳۶ \pm ۹/۸۸ ^a	۵۵/۳۵ \pm ۴/۶۴ ^a	۲/۳۲ \pm ۰/۱۱۲ ^a
۴۳°C	۵۲/۶۲ \pm ۵/۸۲ ^b	۱۱/۱۶ \pm ۴/۳۶ ^b	۱/۰۸ \pm ۰/۰۸۹ ^b
۳۹°C	۷۸/۷۲ \pm ۹/۸۵ ^{c,d}	۳۰/۲۱ \pm ۳/۶۵ ^{c,d}	۱/۷۲ \pm ۰/۰۷۷ ^{c,d}
۳۷°C	۹۴/۳۷ \pm ۹/۰۲ ^{d,e}	۳۵/۷۸ \pm ۴/۰۶ ^d	۱/۸۳ \pm ۰/۰۷۳ ^c
۴۳°C + ژل رویال	۷۳/۴۴ \pm ۸/۶۳ ^c	۲۲/۱۶ \pm ۳/۲۵ ^c	۱/۴۷ \pm ۰/۰۵۸ ^d
۳۹°C + ژل رویال	۱۱۱/۰۹ \pm ۱۱/۸۴ ^{a,e}	۵۰/۵۰ \pm ۲/۹۳ ^a	۲/۱۶ \pm ۰/۰۷۰ ^a
۳۷°C + ژل رویال	۱۱۲/۴۹ \pm ۱۱/۶۳ ^a	۵۲/۶۳ \pm ۲/۶۳ ^a	۲/۲۵ \pm ۰/۱۹۴ ^a

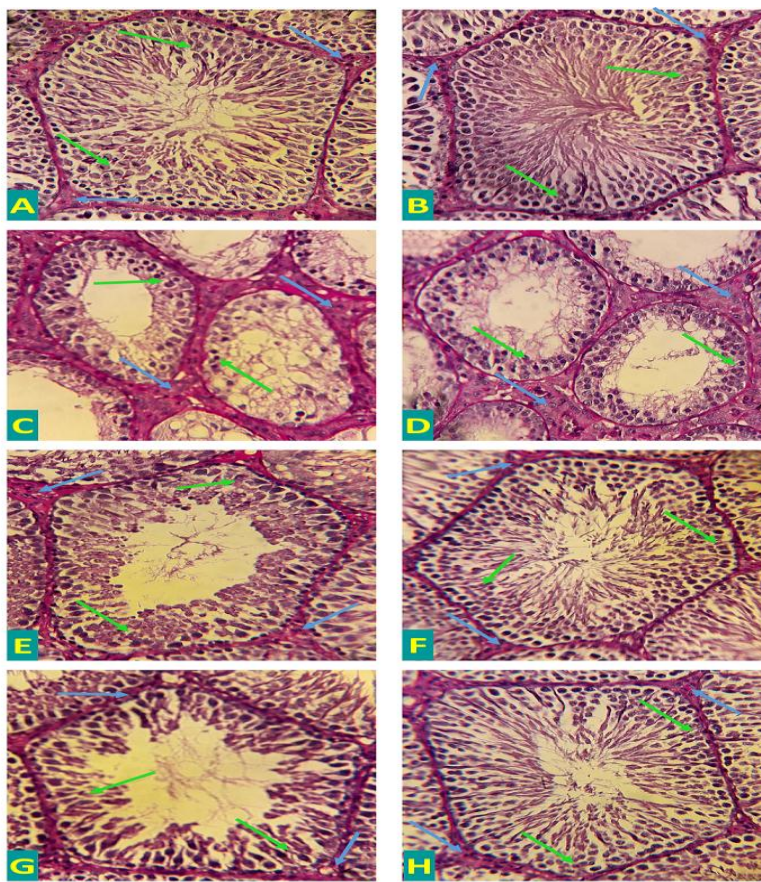
وجود حروف متفاوت در هر ردیف عمودی نشان دهنده تفاوت معنی دار می باشد ($P < 0.05$). نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده اند.

تنش حرارتی (اشکال شماره ۲-C، ۲-E و ۲-G) آتروفی لوله های اسپرم ساز و کاهش ارتفاع اپی تلیوم زایا دیده می شد. در گروه های درمانی (اشکال شماره ۲-F و ۲-H) به جز گروه ۴۳ درجه سانتی گراد+ژل رویال (شکل شماره ۲-D) تا اندازه زیادی از آسیب ها و

ارزیابی ریخت شناختی بافت بیضه: ارزیابی ریخت شناسی بافت بیضه نشان داد که لوله های اسپرم ساز و اپی تلیوم زایای بیضه در گروه های شاهد (شکل شماره ۲-A) و ژل رویال (شکل شماره ۲-B) واجد ساختاری طبیعی می باشند. در بیضه موش های گروه های تحت

رویال(اشکال شماره ۲-F و ۲-H)، واکنش به رنگ آمیزی PAS در سلول های لیدیگ و اپی تلیوم زایای لوله های اسپرم ساز بیضه افزایش محسوسی یافت به جز گروه تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی گراد+ژل رویال که افزایش بارزی را در میزان واکنش به رنگ آمیزی PAS در سلول های لیدیگ و اپی تلیوم زایای لوله های اسپرم ساز بیضه نسبت به گروه تنش حرارتی ۴۳ درجه سانتی گراد نشان نداد.

تغییرات بافتی کاسته شد و ریخت شناسی بافت بیضه به میزان قابل توجهی مشابه گروه های شاهد گردید. هم چنین، در گروه های تحت تنش حرارتی(اشکال شماره ۲-C، ۲-E و ۲-G) واکنش به رنگ آمیزی PAS در سلول های لیدیگ و سلول های اپی تلیوم زایای لوله های اسپرم ساز بیضه به طور مشخصی در مقایسه با گروه های شاهد(شکل شماره ۲-A) و ژل رویال(شکل شماره ۲-B) کاهش نشان داد. در حالی که متعاقب درمان گروه های تحت تنش حرارتی با ژل



شکل شماره ۲. مقطع عرضی بیضه. A: گروه شاهد، B: گروه ژل رویال، C: تنش حرارتی ۴۳°C، D: تنش حرارتی ۴۳°C+ژل رویال، E: تنش حرارتی ۳۹°C، F: تنش حرارتی ۳۹°C+ژل رویال، G: تنش حرارتی ۳۷°C، H: تنش حرارتی ۳۷°C+ژل رویال. در گروه شاهد(A) و ژل رویال(B) سازمان بندی لوله های اسپرم ساز و روند اسپرماتوژنز طبیعی می باشد و دانه های PAS مثبت نیز در سلول های لیدیگ(پیکان های آبی رنگ) و اپی تلیوم زایای لوله های اسپرم ساز بیضه(پیکان های سبز رنگ) مشاهده می گردند. در گروه های تحت تنش حرارتی لوله های اسپرم ساز بیضه ساختار طبیعی خود را از دست داده اند و روند اسپرماتوژنز نیز مختل شده است(C، E و G). در گروه های درمان شده(F و H)، علاوه بر بهبود ساختار بافتی و روند اسپرماتوژنز در لوله های اسپرم ساز بیضه، افزایش چشمگیر میزان واکنش PAS مثبت نیز در سلول های لیدیگ و اپی تلیوم زایای لوله های اسپرم ساز مشهود می باشد(رنگ آمیزی PAS، بزرگ نمایی ۶۰۰ برابر).

بحث و نتیجه گیری

تاکنون مطالعات متعددی در زمینه تاثیر مخرب تنش حرارتی بر روی بافت بیضه و باروری در پستانداران انجام گرفته است (۱۹).

این مطالعه نشان داد که اختلاف معنی داری بین وزن موش های صحرائی تحت تنش حرارتی با سایر گروه ها وجود ندارد ولی کاهش نسبی در وزن بیضه ها وجود دارد که این امر با مطالعات پیشین که در موش صحرائی و میمون انجام گرفته است مطابقت دارد (۱۶).

هم چنین مشخص شده است که میزان کاهش نسبی در وزن بیضه و نیز شدت آسیب بسته به میزان دما، بسامد و مدت زمان قرار گرفتن در معرض حرارت متفاوت است (۲۰).

این مطالعه هم چنین نشان داد که تجویز خوراکی ژل رویال به موش های صحرائی تحت تنش حرارتی سبب بهبود قابل توجه آسیب های بیضه می گردد.

مطالعات صورت گرفته در این زمینه از افزایش وقوع مرگ برنامه ریزی شده سلول یا آپوپتوز در سلول های زایای بافت بیضه پس از قرار گرفتن در درجه حرارت بالا در محوطه بطنی حکایت دارند (۲۱).

در تنش حرارتی، فعالیت آنزیم های اندونوکلیاز منجر به تقسیم DNA در سلول های زایا به زنجیره هایی با وزن مولکولی پایین می شود که این شکسته شدن داخل نوکلئوزومی DNA به عنوان شاخص آپوپتوز در سلول های زایای بافت بیضه به خصوص در اسپرماتوسیت های پاکتی تن و اسپرماتیدها قابل مشاهده می باشد (۲۲).

یکی از مکانسیم های احتمالی تاثیر تنش حرارتی بر روی سلول ها، ایجاد تغییر در پروتئین هایی موسوم به پروتئین تنش حرارتی می باشد. این پروتئین ها در انواع گونه های سلولی در شرایط طبیعی وجود دارند اما میزان آن ها تحت شرایط تنش حرارتی به طور مشخصی افزایش می یابد (۲۳).

پروتئین های تنش حرارتی از دنا توره شدن پروتئین ها و تجمع آن ها در سلول هایی که در معرض تغییراتی هم چون درجه حرارت بالا، واسطه های التهابی و یا عفونت قرار دارند، جلوگیری می کنند (۲۳).

با افزایش حرارت در بافت بیضه میزان پراکسیداسیون چربی در سلول های زایا افزایش می یابد و علاوه بر آن فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی نیز دچار اختلال می شود (۷).

نتایج بررسی های پیشین نشانگر آن است که تنش اکسیداتیو ممکن است نقش مهمی در القاء آپوپتوز تحت شرایط تنش حرارتی ایفاء کند (۲۳).

نشان داده شده است که آنزیم های آنتی اکسیدانت مانند کاتالاز به واسطه بی اثر کردن پراکسید هیدروژن، واجد اثر محافظتی بارزی در برابر آپوپتوز ناشی از تنش حرارتی یا اکسیداتیو می باشند (۲۴).

در مطالعه حاضر شمارش سلول های اسپرماتوژنیک و سرتولی در بافت بیضه گروه های تحت تنش حرارتی کاهش معنی داری را در تعداد این سلول ها نشان داد. به نظر می رسد متعاقب تنش حرارتی، بافت بیضه دچار آسیب شده و روند اسپرماتوژنز مختل می گردد. در مطالعات پیشین نیز نشان داده شده است که اسپرماتوسیت های پاکتی تن و اسپرماتیدهای اولیه در بیضه ها بسیار به حرارت حساس می باشند و به سرعت در اثر افزایش دما در بافت بیضه آسیب می بینند (۲۵).

نتایج این مطالعه نشان داد که اختلالات ناشی از تنش حرارتی در اسپرماتوژنز را می توان با ژل رویال به طور نسبی بهبود بخشید.

با توجه به این که تنش حرارتی در بافت بیضه موجب بروز تنش اکسیداتیو و ظهور رادیکال های آزاد در بافت بیضه می شود (۷)، به نظر می رسد اثرات آنتی اکسیدانتی ژل رویال (۲۶)، از علل بهبود قابل توجه بافت بیضه در موش های صحرائی تحت تنش حرارتی درمان شده با ژل رویال باشد.

نتایج ارزیابی های مورفومتریک در این مطالعه هم چنین نشان داد که قطر لوله های اسپرم ساز و ارتفاع اپی تلیوم زایای این لوله ها در گروه های تحت تنش حرارتی کاهش می یابد که با یافته های گزارشات پیشین در این زمینه هم خوانی داشت (۲۵، ۱۶).

در مطالعه حاضر ژل رویال توانست آسیب های بافتی ناشی از تنش حرارتی را در گروه های درمانی بهبود بخشد که این یافته ها با نتایج به دست آمده از مطالعات پیشین پیرامون نقش محافظتی ژل رویال در

تنش حرارتی می‌زان واکنش به رنگ آمیزی PAS در سلول های لیدیک و اپی تلوم زایای لوله های اسپرم ساز بیضه کاهش می یابد که این امر شاید به دلیل اختلال در دستگاه نقل و انتقال گلوکز و کاهش انرژی لازم جهت تقسیم سلولی باشد که با نتایج مطالعات پیشین بر روی موش های صحرایی مبتلا به نهمان بیضگی تجربی(۳۰) مطابقت دارد. با توجه به یافته های فوق، استفاده از ژل رویال در موارد آسیب بافت بیضه ناشی از تنش حرارتی به سبب دارا بودن ویژگی های ضد التهابی و آنتی اکسیدانتی می تواند سودمند باشد. با این وجود، اثرات محافظتی بافتی ژل رویال در موارد بالینی تنش های حرارتی نیازمند پی ریزی مطالعات گسترده تر می باشد.

References

1. Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AM. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile male. Cambridge Uni Publication. 2000 ;P.232.
2. Stauber M. Mannliche fertilitatsstorungen durch beruflichen stress. Medizinische Monatsschrift. 1973;27:108-10.
3. Gnay Y, Bulut HE, Onarlioglu B, Başimoglu Koca Y. Comparison of the effects of vasectomy and experimental cryptorchidism in Rats. Okajimas Folia Anat Jpn 1998; 75: 61-69.
4. Setchell BP. The parkes lecture heat and the testis. J Rep Fert 1998;114:179-94. doi.org/10.1530/jrf.0.1140179
5. Hikim AS, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. Rev Rep 1999;4:38-47. doi.org/10.1016/S0378-4274(99)00253-2
6. Richburg JH. The relevance of spontaneous and chemically induced alterations in testicular germ cell apoptosis to toxicology. Toxicol let 2000;112:79-86. doi.org/10.1016/S0378-4274(99)00253-2
7. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T. Role of radical oxygen species in Rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. Biol Rep 1999;61:393-9. doi.org/10.1095/biolreprod61.2.393

برابر آسیب های ناشی از دیابت(۲۶) و اکسی متولون در بافت بیضه به سبب دارا بودن خاصیت آنتی اکسیدانتی مطابقت داشت(۲۷).

در مطالعات متعددی به خواص ضد التهابی، ضد سرطانی، ضد میکروبی و آنتی اکسیدانتی ژل رویال اشاره شده است(۲۸). در این مطالعه نیز چنین بر می آید که ژل رویال آسیب های بافتی ناشی از تنش حرارتی در بافت بیضه را به واسطه خواص آنتی اکسیدانتی کاهش داده است.

مطالعات نشان داده است که کربوهیدرات ها به ویژه گلوکز منبع اصلی و ضروری انرژی در تقسیمات میتوزی سلول ها می باشند و هم چنین سد خونی-بیضه ای مسیر اصلی انتقال گلوکز به لوله های اسپرم ساز بیضه محسوب می شود(۲۹). نتایج مطالعه حاضر نیز آشکار ساخت که در گروه های تحت

8. Kim YH, Kim GH, Shin JH, Kim KS, Lim JS. Effect of korean red ginseng on testicular tissue injury after torsion and detorsion. Korean J Urol 2010;51:794-9. doi.org/10.4111/kju.2010.51.11.794
9. Fuji A, Kobayashi S, Kuboyama N, Furukawa Y, Kaneko Y, Ishihama S, et al. Augmentation of wound healing by royal jelly in streptozocin diabetic Rats. Japanese J Pharmacol 1990;53:331-7. doi.org/10.1254/jjp.53.331
10. Nakajima Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Mishima S, Hara H. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. Comple Alt Med 2009;9:4. doi.org/10.1186/1472-6882-9-4
11. Yang A, Zhou M, Zhang L, Xie G, Chen H, Liu Z, Ma W. Influence of royal jelly on the reproductive function of puberty male Rats. Food Chem Toxicol 2012;50:1834-40. doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.098
12. Elnagar SA. Royal jelly counteracts bucks"summer infertility". Anim Rep Sci 2010;121:174-80. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.05.008
13. Nakaya M, Onda H, Sasaki K, Yukiyoishi A, Tachibana H, Yamada K. Effect of royal jelly on bisphenol A-induced proliferation of human breast cancer cells. Biosci Biotechnol Biochem 2007;71:253-5. doi.org/10.1271/bbb.60453

14. Abdelhafiz AT, Muhamad JA. Midcycle pericoital intravaginal bee honey and royal jelly for male factor infertility. *Int J Gynecol Obstet* 2008;101:146-9. doi.org/10.1016/j.ijgo.2007.11.012
15. Yang A, Zhou M, Zhang L, Xie G, Chen H, Liu Z, Ma W. Influence of royal jelly on the reproductive function of puberty male Rats. *Food Chem Toxicol* 2012;50:1834-40. doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.098
16. Venkatachalam PS, Ramanathan KS. Effect of moderate heat on the testes of rats and monkeys. *J Rep Fert* 1962;4:51-6. doi.org/10.1530/jrf.0.0040051
17. Silici S, Ekmekcioglu O, Eraslan G, Demirtas A. Antioxidative effect of royal jelly in cisplatin induced testes damage. *Urology* 2009;74:545-51. doi.org/10.1016/j.urology.2009.05.024
18. Johnsen SG. Testicular biopsy score count a method for registration of spermatogenesis in human testes normal values and results in 335 hypogonadal males. *Horm Res Paediatr* 1970;1:2-5. doi.org/10.1159/000178170
19. Setchell BP. The effects of heat on the testes of mammals. *Anim Rep* 2006;3:81-91.
20. Durairajanayagam D, Agarwal A, Ong C. Causes effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Rep Biomed* 2015;30:14-27. doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.09.018
21. Shikone T, Billig H, Hsueh AJ. Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in Rat testis. *Biol Rep* 1994;51:865-72. doi.org/10.1095/biolreprod51.5.865
22. Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh AJ. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 1995 1;136:5-12. doi.org/10.1210/en.136.1.5
23. Sarge KD, Cullen KE. Regulation of hsp expression during rodent spermatogenesis. *Cell Mole Life Sci* 1997;53:191-7. doi.org/10.1007/PL00000591
24. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology today*. 1994 Jan 1;15:7-10. doi.org/10.1016/0167-5699(94)90018-3
25. Setchell BP, Ploen L, Ritzen EM. Effect of local heating of Rat testes after suppression of spermatogenesis by pretreatment with a GnRH agonist and an anti-androgen. *Reproduction* 2002;124:133-40.
26. Ghanbari E, Nejati V, Najafi G, Khazaei M, Babaei M. Study on the effect of royal jelly on reproductive parameters in streptozotocin-induced diabetic Rats. *Int J fertility Ste* 2015;9:113. doi.org/10.22074/ijfs.2015.4215
27. Najafi G, Nejati V, Jalali AS, Zahmatkesh E. Protective role of royal jelly in oxymetholone induced oxidative injury in Mouse testis. *Iranian J Toxicol Vol* 2014;8:1073-1080.
28. Amirshahi T, Najafi G, Nejati V. Protective effect of royal jelly on fertility and biochemical parameters in bleomycin induced male rats. *Iranian J Rep Med* 2014; 12:209.
29. Seema P, Swathy SS, Indira M. Protective effect of selenium on nicotine induced testicular toxicity in Rats. *Biol Trace Ele Res* 2007;120:212-8. doi.org/10.1007/s12011-007-8021-7
30. Liu F, Huang H, Xu ZL, Qian XJ, Qiu WY. Germ cell removal after induction of cryptorchidism in adult Rats. *Tissue Cell* 2012;44:281-7. doi.org/10.1016/j.tice.2012.04.005

The Protective Effect of Royal Jelly on Testicular Histomorphometry and Spermatogenesis in Heat-Stress Exposed Male Rats

Mahdivand N^{1*}, Nejat V¹, Najafi G², Shalizarjalali A², Rahmani F¹

(Received: September 17, 2017

Accepted: January 14, 2018)

Abstract

Introduction: Scrotal hyperthermia has been known as a cause of male infertility. Testicular heat-stress even for a single short period can induce destruction in testicular tissue and spermatogenesis disturbances. This study was conducted to determine the protective effects of royal jelly (RJ) against testicular damage and spermatogenesis following heat-stress induction in male rats.

Materials & Methods: In this experimental study, 48 male rats were randomly divided into 8 groups (n=6) including: 1- Control, 2- RJ (100 mg/kg BW/day; PO), 3, 4 and 5 heat-stressed (43, 39, and 37 °C for 20 min per day, respectively) and 6, 7 and 8 heat-stressed along with RJ (43, 39, and 37 °C for 20 min per day, respectively plus RJ at a dose of 100 mg/kg BW/day; PO). Heat-stress was induced through immersion of experimental rat scrotums in a water bath. After 48 days, the animals were sacrificed and left testes were removed and fixed. Five-micrometer testicular tissue sections

were prepared and studied using a light microscope.

Findings: The data revealed that diameter and germinal epithelium height of the seminiferous tubules, thickness of basement membrane, number of spermatogenic and Sertoli cells, and testicular weight decreased significantly ($p < 0.05$) in heat-stress groups compared to control and RJ groups. Interestingly, RJ co-administration significantly ($p < 0.05$) ameliorated above-noted parameters in all heat-stress-exposed animals except in 43°C heat-stress + RJ group.

Discussion & Conclusions: RJ administration can protect testicular tissue changes and prevent reduction of spermatogenic cell counts in testicular heat stress conditions.

Keywords: Heat Stress, Royal Jelly, Spermatogenesis, Testis, Rat

1. Dept of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

2. Dept of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

* Corresponding author Email: n_mehdivand@yahoo.com