Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 20, No. 2, Summer 2020, Pages 200-211

Protective Effect of Royal Jelly on Sperm Parameters and *bak* Gene Expression Following Lead Acetate poisoning in Mice

Soleimanzadeh A*[1], Shalizarjalali A[2], Abdollahi A[1], Sabzeie MM[1]

1. Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
2. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
**** Corresponding author.*** Tel: +984432750508; Fax: +984432777099; E-mail: a.soleimanzadeh@urmia.ac.ir.

Received: May 10, 2020 Accepted: Aug 20, 2020

ABSTRACT

***Background & objectives*:** The present study investigated the effects of royal jelly on lead acetate induced toxicity on sperm parameters, reproductive hormone assay, and *bak* gene expression in NMRI male mice.

***Methods*:** In this study, fifty four male mice were randomly divided into nine groups: control group (without royal jelly) (n=6); sham group(10 ml normal saline) (n=6); lead group (1000 ppm, oral) (n=6); Group 4: royal jelly (100 mg/kg/day, oral) (n=6); Group 5: royal jelly (250 mg/kg/day, oral)(n=6); Group 6: royal jelly (500 mg/kg/day, oral)(n=6); Group 7: royal jelly (100 mg/kg/day, oral) + 1000 ppm lead (n=6); Group 8: royal jelly (250 mg/kg/day, oral) + 1000 ppm lead (n=6) and Group 9: royal jelly (500 mg/kg/day, oral) + 1000 ppm lead (n=6). On day 35, blood samples were collected from anaesthetized mice by cardiac puncture to assess reproductive hormones and the testes were harvested for determination of sperm parameters and expression *bak* gene. Sperm parameters including motility, viability, DNA damage, morphology and total antioxidant capacity (TAC) levels were determined.

***Results*:** The results showed that administration of royal jelly significantly enhanced sperm parameters and all reproductive hormone levels compared to control mice, (p<0.05). Also, treatment with lead acetate caused a significant reduction in levels of all reproductive hormones and a significant diminution in sperm motility, morphology, viability; with an increase in percentage of dead spermatocytes (p<0.05). The co-administration of the 250 and 500 mg/kg/day royal jelly with lead acetate could ameliorate the deleterious effects of lead acetate resulting in a significant increase in sperm parameters and all reproductive hormones and increase the total antioxidant capacity (TAC) levels (p<0.05). Also, the expression of *bak* gene in all treated (sham, royal jelly groups) and control groups was significantly lower than the lead acetate group (p<0.05).

***Conclusion*:** In conclusion, our findings suggest that the royal jelly has a beneficial effect on male reproductive parameters following lead acetate induced toxicity in mice.

***Keywords*:** Reproductive Hormone; Sperm Parameters; Royal Jelly; Lead Acetate; Mice

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOI: 10.52547/jarums.20.2.200]

بررسی اثر محافظتی ژل رویال بر پارامترهای اسپرم و میزان بیان ژن *bak* به‌دنبال مسمومیت با استات سرب در موش آزمایشگاهی

علی سلیمان زاده [۱*]، علی شالیزار جلالی [۲]، عبدالرحیم عبداللهی [۱]، محمدمعین سبزه ای [۱]

۱. گروه مامایی و بیماری‌های تولیدمثل دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۴۳۲۷۷۰۵۰۸ فاکس: ۰۴۴۳۲۷۷۷۰۹۹ ایمیل: a.soleimanzadeh@urmia.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: مطالعه حاضر به بررسی تاثیر ژل رویال بر سمیت ناشی از استات سرب بر پارامترهای اسپرم، سنجش هورمون‌های تولیدمثلی و بیان ژن باک در موش‌های نر کوچک آزمایشگاهی نژاد NMRI پرداخته است.

روش کار: در این بررسی، پنجاه و چهار موش نر به طور تصادفی به ۹ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل (بدون ژل رویال) (۶ سر). گروه شم (۱۰ میلی لیتر نرمال سالین) (۶ سر)؛ گروه سرب (۱۰۰۰ ppm ، خوراکی) (۶ سر)؛ گروه ٤: ژل رویال (۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم در روز، خوراکی) (۶ سر)؛ گروه ۵: ژل رویال (۲۵۰ میلی گرم در کیلوگرم در روز، خوراکی) (۶ سر)؛ گروه ۶: ژل رویال (۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم در روز، خوراکی) (۶ سر)؛ گروه ۷: ژل رویال (۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم در روز، خوراکی)+ ۱۰۰۰ ppm سرب (۶ سر)؛ گروه ۸: ژل رویال (۲۵۰ میلی گرم در کیلوگرم در روز، خوراکی)+ ۱۰۰۰ ppm سرب (۶ سر) و گروه ۹: ژل رویال (۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم در روز، خوراکی)+ سرب ۱۰۰۰ ppm (۶ سر). در روز ۳۵، خونگیری از موش های بیهوش شده از طریق قلب برای آزمایش هورمون های جنسی و بیضه ها برای بررسی پارامترهای اسپرم و بیان ژن *bak* جمع آوری شد. پارامترهای اسپرم شامل تحرک، قابلیت زنده مانی، آسیب DNA و مورفولوژی و میزان سطح ظرفیت کل آنتی اکسیدان (TAC) انجام شد.

یافته ها: نتایج به دست آمده نشان داد که مصرف ژل رویال در مقایسه با موش‌های گروه کنترل، باعث افزایش معنی‌دار پارامترهای اسپرم و سطح هورمون های جنسی شد ($p<۰/۰۵$). همچنین درمان با استات سرب باعث کاهش معنی‌دار در سطح هورمون‌های جنسی و کاهش قابل توجه تحرک، مورفولوژی، قدرت زنده مانی اسپرم، با افزایش درصد اسپرم‌های مرده شد ($p<۰/۰۵$). مصرف همزمان ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در روز ژل رویال با استات سرب توانست اثرات مضر استات سرب را بهبود بخشد و منجر به افزایش قابل توجهی در پارامترهای اسپرم و هورمون‌های جنسی و سطح کل آنتی اکسیدان (TAC) شد ($p<۰/۰۵$). همچنین میزان بیان ژن *bak* در گروه کنترل و گروه های ژل رویال به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) نسبت به گروه استات سرب کمتر بود.

نتیجه گیری: یافته های مطالعه حاضر نشان داد که ژل رویال اثرات محافظتی بسزایی در برابر سمیت تولیدمثلی ناشی از استات سرب در موش‌های کوچک آزمایشگاهی دارد.

واژه های کلیدی : پارامترهای اسپرم، هورمون های استروئیدی، ژل رویال، استات سرب، موش آزمایشگاهی

دریافت: ۱۳۹۹/۲/۲۱ **پذیرش:** ۱۳۹۹/۵/۳۰

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOI: 10.52547/jarums.20.2.200]

مقدمه

تماس فزاینده با آلاینده‌های محیطی و مواد شیمیایی به‌عنوان اصلی‌ترین عامل بروز مشکلات بهداشت باروری در نظر گرفته می‌شود [۱،۲]. حدوداً ۱۵ درصد زوج‌های انسانی تحت تاثیر ناباروری قرار می‌گیرند و تقریباً نیمی از موارد ناباروری را می‌توان به مردان نسبت داد [۳]. همچنین تماس با مواد شیمیایی و آلاینده‌های محیطی کیفیت اسپرم مردان را کاهش می‌دهد [٤،٥]. مطالعات انسانی، حیوانی و آزمایشگاهی نشان داده است که تماس محیطی یا شغلی با فلزات سنگین ممکن است سلامت باروری مردان را تحت تاثیر قرار دهد.

سرب جزو فلزات بسیار سمی برای انسان و سایر پستانداران است که در محیط زندگی انسان فراگیر هستند و در طول زندگی، در بدن خصوصاً استخوان‌ها تجمع پیدا می‌کنند. جدا از منابع بی‌شمار شغلی که انسان را در معرض تماس با سرب قرار می‌دهند، مهمترین منابع غیرشغلی آلودگی انسان با سرب عبارتند از: غذاها (خصوصاً غذاهایی که از مناطق آلوده به فلزات سنگین حاصل شده‌اند)، آب (در اثر تماس آب نرم و اسیدی با لوله‌های سربی)، هوا (عمدتاً در اثر استنشاق هوای آلوده در مناطق ترافیکی و متراکم)، رنگ‌هایی که پایه سربی دارند، عادت سیگارکشیدن و مصرف نوشیدنی‌های الکلی آلوده به سرب [۵].

در سال‌های اخیر استفاده از سرب در رنگ‌ها، خطوط لوله و صنایع به‌دلیل عوارض جانبی ناگوار در چندین کشور محدود شده است. گزارش‌های قبلی حاکی از آن است که ۰/۱۵ درصد از تجویز استات سرب باعث تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) می‌شود. این میزان افزایش در رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌تواند منجر به استرس اکسیداتیو و بسیاری از واکنش‌های دژنراتیو در سطح بافت شود که منجر به تغییر در پروتئین‌های DNA، تغییرات پاتولوژی مهم در بافت بیضه، کاهش اسپرم و تغییرات سر اسپرم مثل بزرگ شدن آن، کاهش میانگین قطر داخلی مجاری لوله‌های اسپرم‌ساز و میزان تکثیر سلول‌های زاینده در رده‌های اسپرماتوسیت I و II، تأثیر بر ساختار دستگاه تولیدمثل جنس نر، روند اسپرماتوژنزمی‌شود [۸-۶]. از جمله رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توان به سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال‌های هیدروکسیل (HO^-) اشاره کرد که به‌صورت مستقیم به غشای اسپرم (که دارای مقادیر بالایی اسید چرب غیراشباع با پیوند دوگانه است) و DNA اسپرم حمله می‌کنند و منجر به کاهش تحرک و القای آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلول) می‌شوند، در نتیجه اسپرم‌های کمتری می‌توانند به تخمک برسند و این امر منجر به کاهش باروری می‌شود [۹،۱۰]. آپوپتوز یک پاسخ غیر التهابی به آسیب بافتی است. در سیستم تناسلی حیوان نر، آپوپتوز سبب از بین رفتن اسپرم‌های غیرطبیعی می‌شود. بنابراین عمل نکردن آپوپتوز سبب بوجودآمدن جمعیت زیادی از اسپرم‌های غیرطبیعی می‌گردد [۱۱]. تحقیقات قبلی رابطه مثبتی را بین آپوپتوز اسپرم ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن و بیان بیش از حد ژن *Bak* در مردان مبتلا به ناباروری برقرار کرده است [۱۲].

برای غلبه بر خسارات ناشی از سرب، مطالعات عمدتاً روی درمان‌های آنتی اکسیدانی انجام شده است که اثرات محافظتی روی سمیت تولید مثل ناشی از سرب دارند [۱۳،۱٤]. ترکیبات آنتی اکسیدانی در واکنش‌های تک الکترون با رادیکال‌های آزاد در داخل بدن واکنش نشان می‌دهند و از آسیب اکسیداتیو جلوگیری می‌کنند. بنابراین، آنتی اکسیدان‌های طبیعی نه تنها نقش مهمی در پیشگیری و درمان کمکی بیماری‌ها دارند بلکه می‌توانند از بروز عوارض جانبی برای سلامتی انسان جلوگیری کنند [۱۵].

ژل رویال یک ماده طبیعی است که یکی از مهمترین محصولات زنبور عسل به حساب می‌آید. ژل رویال از غدد موجود در هیپوفارنکس زنبور عسل کارگر

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOI: 10.52547/jarums.20.2.200]

ساخته می‌شود و از آن برای تغذیه تمامی لاروها صرف نظر از جنسیت استفاده می‌شود [۱۶]. تجزیه و تحلیل ترکیب شیمیایی نشان می‌دهد که این ماده طبیعی حاوی مخلوط پیچیده ای از اسیدهای آمینه آزاد، پروتئین‌ها، قندها، اسیدهای چرب (عمدتاً ۱۰-هیدروکسی-۲-دکنوئیک اسید)، مواد معدنی (عمدتاً آهن و کلسیم)، ویتامین‌ها (به طور عمده تیامین، نیاسین و غیره) است [۱۷]. مطالعات مختلف خاصیت آنتی اکسیدانی ژل رویال را نشان داده است [۱۸-۲۱].

بر این اساس هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات آنتی اکسیدانی ژل رویال بر پارامترهای اسپرم، هورمون‌های استروئیدی و میزان بیان ژن *bak* بدنبال سمیت تولید مثل ناشی از استات سرب (مسمومیت خوراکی) در موش آزمایشگاهی بود.

روش کار

برای انجام مطالعه حاضر از ۵۴ سر موش آزمایشگاهی نر بالغ نژاد ان ام ار ای (NMRI) جوان ۸-۶ هفته‌ای، با میانگین وزنی ۶±۳۰ گرم که از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه شده بود استفاده شد. آزمایشات بر روی حیوانات مطابق دستورالعمل‌های کمیته اخلاقی تحقیق در حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه ارومیه انجام شد (کد اخلاقی: IR-UU-AEC-۳آذ/۲۰۲۰؛206). حیوانات در شرایط استاندارد دمایی (°C ۲۲±۲) و با سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی با دسترسی کامل به آب و غذای کافی در ۹ گروه درمانی (هر گروه۶ سر) در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه نگهداری شدند. موش‌های گروه کنترل سالم، هیچ دارویی دریافت نکردند. در گروه شم، موش‌ها به مقدار ۱۰ میلی لیتر نرمال سالین دریافت کردند. در گروه کنترل بیمار، موش‌ها به میزان ppm ۱۰۰۰ استات سرب بصورت خوراکی دریافت کردند [۲۲].

در سه گروه تیمار همزمان با مصرف استات سرب، ژل رویال به مقدار ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم به ازای هرکیلوگرم در روز [۲۳] که در نرمال سالین حل شده بود، استفاده شد و در سه گروه هم فقط ژل رویال با همان دوزهای مشخص استفاده گردید. موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی موجود در هر گروه پس از اتمام دوره درمان ۳۵ روزه [۲۴]، با استفاده از داروی کتامین (۷۵ mg/kg; IP) و سپس توسط جابه‌جایی مهره‌های گردن آسان‌کشی شدند [۲۵] و پس از کالبدگشایی، بیضه‌ها و اپیدیدیم با رعایت اصول استریل سریعاً برداشته شد. در این مطالعه استات سرب از شرکت سیگما (5G-316512) و ژل رویال از شرکت سانتاکروز بیوتکنولوژی (sc-296279) تهیه شد.

ارزیابی پارامترهای اسپرم

به منظور ارزیابی خصوصیات اسپرم ابتدا اپیدیدیم از بافت بیضه جدا شده و بافت‌های اطراف آن تمیز گردید. بلافاصله دم اپیدیدیم درون پتری‌دیش‌های حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت HTF[1] قرارگرفت. برای جلوگیری از ایجاد شوک حرارتی و آسیب به اسپرم‌ها، تمام وسایل مورد استفاده و محیط کشت قبل از مصرف در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شدند. سپس دم اپیدیدیم در داخل محیط کشت به قطعات کوچک خرد شده و به مدت ۲۰ دقیقه در درون محیط کشت در انکوباتور باقی ماندند تا امکان خروج اسپرم‌ها از اپیدیدیم فراهم آید. در نهایت سوسپانسیون حاوی اسپرم با استفاده از محیط کشت به نسبت ۱ به ۲۰ [۲۶] رقیق گردید [۲۷]. پس از استحصال اسپرم از دم اپیدیدیم ارزیابی شمارش اسپرم و میزان تحرک اسپرم‌هاارزیابی شدند.

بررسی تحرک اسپرم

جهت بررسی تحرک اسپرم، از پروتکل آزمایشگاهی WHO استفاده شد. در این بررسی ۱۰µl از هر گروه بر روی لام ۳۷ درجه بر روی میکروسکوپ نوری

[1] Human Tubal Fluid

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOI: 10.52547/jarums.20.2.200]

(Olympus, BX41, Tokyo, Japan) ریخته و حداقل در پنج میدان دید میکروسکوپی، تحرک اسپرم‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند (تعداد ۲۰۰ اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت) [۲۸].

بررسی قابلیت زنده مانی

جهت بررسی میزان قدرت زنده‌مانی اسپرم‌ها رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین مورد استفاده قرار گرفت. مبنای تشخیص اسپرم‌های زنده از اسپرم‌های مرده در این روش رنگ‌آمیزی بر این اصل استوار است که در اثر آسیب به غشاءِ پلاسمایی، اسپرم‌ها در برابر رنگ مذکور نفوذپذیر می‌گردند. بنابراین آن دسته از اسپرم‌هایی که رنگ گرفته بودند به عنوان اسپرم‌های مرده در نظر گرفته شدند. در این مطالعه، تعداد ۲۰۰ اسپرم مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل در قالب درصد بیان شدند [۲۹].

بررسی آسیب DNA اسپرم

جهت بررسی آسیب DNA اسپرم‌ها از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج استفاده گردید. اسمیرهای تهیه‌شده، بعد از فیکس شدن در محلول فیکساتور کارنوی، به‌مدت ۵ دقیقه با رنگ آکریدین اورنج رنگ‌آمیزی شدند. سپس اسلایدها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Model GS7, Nikon Co., Tokyo, Japan) بررسی گردیدند. در این بررسی ۲۰۰ عدد اسپرم مورد بررسی قرار گرفت که اسپرم‌های با DNA یکپارچه به رنگ سبز و DNA دناتوره به رنگ زرد تا نارنجی دیده شدند [۳۰].

ارزیابی سطح هورمونی

همزمان با بیهوشی موش‌های کوچک آزمایشگاهی، خونگیری از قلب آنها انجام گردید و سپس توسط دستگاه سانتریفیوژ، با دور ۳۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا سرم آنها جدا گردید. سرم موجود در لوله‌ها به وسیله سمپلر به میکروتیوب‌های دیگر منتقل شده و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری هورمون‌ها نگهداری شدند. سطح سرمی تستوسترون، LH و FSH با استفاده از کیت الایزا (Diablast Co. USA) اندازه‌گیری شدند.

ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی بر اساس احیاء آهن (FRAP[1])

جهت ارزیابی قدرت تام آنتی اکسیدانی از روش ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی بر اساس احیاءِ آهن یا FRAP استفاده شد، بدین صورت که ابتدا معرف FRAP تهیه شد، سپس ۱ میلی لیتر از معرف تازه FRAP به ۵۰ میلی لیتر از نمونه‌های سرم اضافه گردید. معرف FRAP مخلوط کلرید آهن ($FeCl_3$) و ۲،٤،۶-Tripyridyl-S-triazine (TPTZ) است که در یک بافر حل شده است. این مخلوط بیرنگ تا زرد رنگ می‌باشد و زمانی که نمونه به این محلول اضافه می‌شود و این کمپلکس احیاءِ می‌شود، رنگ آبی را می‌دهد که در طول موج ۵۹۳ نانومتر توسط دستگاه فلوسایتومتر قرائت شدند [۳۱].

ارزیابی ژن آپوپتوز *bak* از بافت بیضه

جهت ارزیابی میزان بیان ژن آپوپتوز *bak* در بافت بیضه در مطالعه حاضر از همان بیضه ای که ارزیابی اسپرم‌ها انجام شد استفاده گردید. استخراج RNA با استفاده از کیت (CinnaPure-RNA) شرکت سیناکلون (Cat. No.: PR891620) و ساخت cDNA با استفاده از کیت Viva 2-steps RT-PCR شرکت (Cat. No.: RTPL12-100app) صورت گرفت. برنامه حرارتی مورد استفاده شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۱۵ دقیقه، ۶۰ ثانیه مرحله اتصال در دمای ۶۲ درجه و مرحله طویل‌شدن در دمای ۷۰ درجه به مدت ۲۰ ثانیه و مرحله طویل شدن اضافی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه، بود. محصولات بدست آمده در ژل آگارز ۱/۵ درصد با مارکر ۱۰۰bp الکتروفورز شد. نمونه‌های cDNA تهیه شده برای بررسی میزان بیان نسبی ژن *bak* [۳۲] به روش Realtime-PCR و

[1] Ferric Reduction Antioxidant Power

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOI: 10.52547/jarums.20.2.200]

با استفاده از دستگاه StepOne™ (Applied Biosystems) در مقایسه با ژن *18sRNA* (جدول ۱) به عنوان ژن رفرنس مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR و RT-PCR

نام ژن	توالی پرایمر	سایزژن (bp)
bak	5′-CCCAGGACACAGAGGAGGTC-3′ 5′-GCCCAACAGAACCACACCAAAA-3′	۵۱۸
18S rRNA	5′-CGCGGTTCTATT TTGTTGGT-3′ 5′-AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3′	۲۱۹

آنالیزهای آماری

داده‌های این مطالعه با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-23 مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت مقایسه بین گروه‌ها آنالیز واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن تست‌های مقایسه‌ای چندگانه توکی مورد استفاده قرار گرفت. مقدار $p<۰/۰۵$ برای تعیین سطح معنی‌داری بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی پارامترهای اسپرم

نتایج حاصل از شمارش اسپرم‌ها و مقایسه آنها بین گروه‌های کنترل، شم، کنترل بیمار و گروه‌های تیمار نشان دادند که بعد از تحت درمان قرار گرفتن با سرب در موش‌های گروه‌های آزمایشی تعداد اسپرم‌های موش‌ها کاهش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) را در مقایسه با گروه کنترل شم نشان دادند (جدول ۲). همچنین در گروه‌هایی که سرب را به همراه ژل رویال دریافت کردند، با افزایش میزان دوز ژل رویال در گروه‌های تحت درمان، تعداد اسپرم در گروه‌ها به گروه کنترل نزدیک شد (جدول ۲). در ارزیابی نتایج حاصل از تحرک اسپرم‌ها، نشان داده شد که درصد تحرک اسپرم‌ها در گروه‌های کنترل و تحت درمان با دوزهای مختلف ژل رویال نسبت به گروه سرب افزایش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) داشت، همچنین نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که با افزایش دوز ژل رویال در گروه‌های تحت درمان، درصد تحرک اسپرم‌ها بهبود بیشتری یافتند (جدول ۲). نتایج حاصل از درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها در گروه‌های سرب و کنترل، به ترتیب ۱/۲۷±۵۷/۸٤ و ۱/۳۳±۸۱/۰۸ می‌باشد که نشان می‌دهد درصد زنده‌مانی در گروه سرب کاهش ($p<۰/۰۵$) یافته است (جدول ۲). همچنین نتایج درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها در سایر گروه‌های درمانی نشان داد که با افزایش دوز ژل رویال درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها افزایش یافته و به گروه کنترل نزدیک شده است (شکل ۱). رنگ‌آمیزی اسپرم‌ها باآکریدین اورنج نشان داد که در گروه‌های کنترل و گروه‌هایی که ژل رویال را دریافت کرده بودند، درصد اسپرم‌هایی که DNA دو رشته‌ای ناپیوسته داشتند بطور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$)، نسبت به گروه سرب پایین‌تر بود (شکل ۲). نتایج حاصل از ریخت شناسی اسپرم‌ها نشان داد که گروه‌های سرب و سرب+ ژل رویال ۱۰۰ بطور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) دارای درصد کمتری از ریخت شناسی طبیعی نسبت به بقیه گروه‌های درمانی هستند (جدول ۲). همچنین ارزیابی درصد ریخت شناسی طبیعی اسپرم‌ها نشان داد که افزایش دوز ژل رویال در گروه‌هایی که سرب را به همراه ژل رویال دریافت می‌کردند، توانست درصد ریخت شناسی طبیعی را بهبود داده و به گروه‌های کنترل و شم نزدیک نماید (جدول ۲).

بررسی قدرت تام آنتی اکسیدانی (TAC)

نتایج حاصل بررسی TAC نشان داد که تجویز سرب سبب کاهش معنی دار ($p<۰/۰۵$) ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی گردید. همچنین ژل رویال از کاهش ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در گروه‌هایی که سرب با

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOI: 10.52547/jarums.20.2.200]

دوزهای مختلف ژل رویال در آنها دریافت شده بود، جلوگیری نمود (جدول ۳).

ارزیابی هورمون‌تستوسترون و LH و FSH

هر سه هورمون در گروه دریافت‌کننده سرب نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) یافته بود. همچنین در گروه‌هایی که سرب را با ژل رویال دریافت کرده بودند، سطح این هورمون‌ها با افزایش دوز ژل رویال بهبود یافت و افزایش ($p<۰/۰۵$) را نشان دادند (جدول ۳).

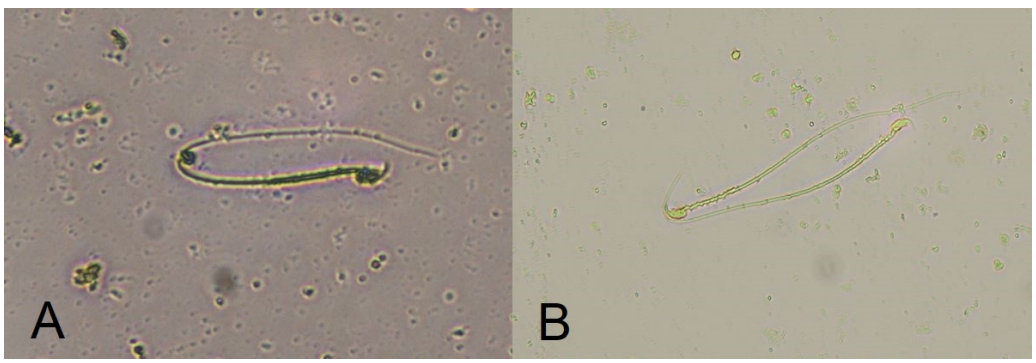
نتایج حاصل از RealTime-PCR

برای بررسی صحت و حصول اطمینان از درست بودن محصول cDNA، محصولات تکثیرشده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمرهای ژن‌های *bak* در ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و باندی با اندازه ۵۱۸bp بدست آمد. میزان بیان نسبی ژن *bak* در بافت بیضه با استفاده از مقادیر ct بدست آمده برای هر یک از نمونه‌ها و مقادیر ct ژن رفرانس محاسبه گردید. در بیان ژن *bak* در بین تمامی گروه‌ها اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) مشاهده شد. نتایج حاصل از میزان بیان ژن *bak* در گروه‌های درمانی نشان داد که میزان بیان ژن *bak* در گروه استات سرب نسبت به گروه‌های کنترل و شم افزایش ($p<۰/۰۵$) معنی‌داری داشت (جدول ٤). همچنین گروه‌هایی که ژل رویال را دریافت کرده بودند، نشان داده شد که افزایش ژل رویال توانست میزان بیان ژن *bak* را کاهش داده و به گروه کنترل نزدیک نماید (جدول ٤).

جدول ۲. مقایسه میانگین پارامترهای اسپرمی در گروه‌های مختلف درمانی (Mean±SEM)

پارامترهای اسپرم	شمارش اسپرم ($۱۰^۶$)	تحرک اسپرم (٪)	قابلیت زنده ماندن اسپرم (٪)	ریخت شناسی طبیعی اسپرم (٪)	آسیب DNA (٪)
کنترل	۲۷/۱۱±۱/٤۷[a]	۷۶/۲٤±۱/۳۲[a]	۸۱/۰۸±۱/۳۳[a]	۹۰/۳۷±۱/۷۱[a]	۳/۰۸± ۱/۱٤[a]
شم (نرمال سالین)	۲۶/۳۵±۱/۳۹[a]	۷۵/۲۸±۱/۵۶[a]	۷۹/۷۳±۱/۸۱[a]	۸۹/۲۰±۱/۱۹[a]	۲/۹٤± ۱/۳۷[a]
ژل رویال ۱۰۰	۲۷/۰۶±۱/۷۳[a]	۷۶/۳۸±۱/۷۷[a]	۸۱/۶۶±۲/٤۵[a]	۸۹/۷٤±۱/۸۲[a]	۳/۱۱± ۱/۳۶[a]
ژل رویال ۲۵۰	۲۷/۵۵±۲/۱۶[a]	۷۶/۳۳±۱/۰۷[a]	۸۲/۰۱±۱/۲۹[a]	۹۰/٤۸±۱/۳۰[a]	۳/۰۹± ۱/۷۹[a]
ژل رویال ۵۰۰	۲۷/۶۰±۱/۵۹[a]	۷۷/۲۹±۱/٤٤[a]	۸۲/۳۷±۱/۵۰[a]	۹۰/۶۹±۱/۰٤[a]	۳/۱۱± ۱/۲۸[a]
سرب (۱۰۰۰ ppm)	۱۱/۷۷±۰/۸۱[b]	۵۱/٤۹±۱/۲۸[b]	۵۷/۸٤±۱/۲۷[b]	۷۶/٤۸±۱/۶۳[b]	۱۸/۷۹±۰/۸۸[b]
سرب + ژل رویال ۱۰۰	۱۲/۱۹±۱/۳۹[b]	۵۳/۶۰±۱/۳۹[c]	۵۹/۶۳± ۰/۹۲[c]	۷۷/۳۸±۱/۲۸[b]	۱۶/۹۲±۱/٤۰[c]
سرب + ژل رویال ۲۵۰	۱۵/۲۶±۱/۳۸[c]	۵۸/۰۷±۱/۱۸[d]	۶٤/۲۰±۱/۶۲[d]	۸٤/۱۱±۱/۷۸[c]	۱۳/۳۵±۱/۳۹[d]
سرب + ژل رویال ۵۰۰	۱۸/۶۱±۱/۱۷[d]	۶۱/۳۸±۱/۶۲[e]	۷۱/٤٤±۱/٤۰[e]	۸۵/۶۲±۱/۶۰[c]	۸/۷۰±۱/۱۲[e]

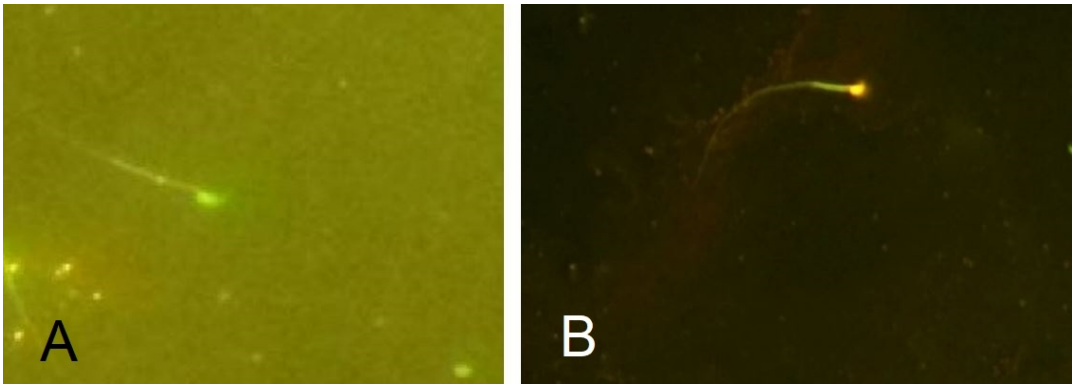
*حروف مختلف نشانگر اختلاف معنی دار بین داده‌ها می‌باشد ($p<0.05$). (داده‌ها به صورت ستونی با هم مقایسه شدند).



شکل ۱. ارزیابی قابلیت زنده ماندن ؛A) اسپرم‌های قرمز رنگ نشان دهنده اسپرم‌های مرده می‌باشد؛ B) اسپرم‌های بی رنگ نشان دهنده اسپرم‌های زنده می‌باشد. رنگ‌آمیزی ائوزین–نگروزین. بزرگنمایی 400X

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOI: 10.52547/jarums.20.2.200]



شکل ۲. ارزیابی تمامیت DNA در اسپرم‌ها؛ A) اسپرم‌های با سر سبز رنگ نشان دهنده DNA طبیعی و دست نخورده می‌باشد؛ B) اسپرم‌های با سر نارنجی نشان دهنده DNA دناتوره شده می‌باشد. رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج. بزرگنمایی 200X

جدول ۳. میزان ظرفیت تام آنتی اکسیدانی و هورمون‌ها در گروه‌های مختلف درمانی

	قدرت تام آنتی اکسیدانی ($\mu mol\ L^{-1}$)	تستوسترون ($\mu mol\ L^{-1}$)	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)
کنترل	۲/۲۱±۱/۱۱^{a}	۶/۰۷±۱/۳۷^{a}	۳/۲۰± ۰/۹۲^{a}	٤/٤۰±۱/۸٤^{a}
شم (نرمال سالین)	۲/۲۲±۱/٤۸^{a}	۵/۸۹±۱/۶۶^{a}	۳/۲۱±۱/٤۲^{a}	٤/۳۸±۱/۵۹^{a}
ژل رویال ۱۰۰	۲/۲۵±۱/۶۳^{a}	۵/۷۶±۱/۳۷^{a}	۳/۲۰±۰/۹۲^{a}	٤/٤۳±۱/۳۰^{a}
ژل رویال ۲۵۰	۲/٤۸±۱/۵۰^{a}	۶/۱۳±۱/۳۷^{a}	۳/۱۱±۱/٤۷^{a}	٤/۶۶±۱/۷۸^{a}
ژل رویال ۵۰۰	۲/۸۸±۱/۰٤^{a}	۶/۱٤±۱/۵۵^{a}	۳/۲۵±۱/۶۳^{a}	٤/۵۹±۱/۳۹^{a}
سرب (۱۰۰۰ ppm)	۰/۵۶±۱/۱٤^{b}	۳/۱۹±۱/۳٤^{b}	۰/۶٤±۱/۳۳^{b}	۱/۵۲±۱/۳۹^{b}
سرب + ژل رویال ۱۰۰	۰/۹۳±۱/۲۰^{c}	۳/۳۶±۱/٤۶^{b}	۰/۷۶±۶۲۱^{b}	۱/۹۱±۱/۲۱^{c}
سرب + ژل رویال ۲۵۰	۱/٤٤±۰/۶۹^{d}	٤/۲۲±۱/۰۸^{c}	۱/۱۹±۱/۱۷^{c}	۲/۵۰± ۰/۳۷^{d}
سرب + ژل رویال ۵۰۰	۱/۸۷±۱/۲۳^{e}	٤/۵۷±۱/۲۶^{c}	۲/۰۵±۱/۰۸^{c}	۲/۸۸±۱/۱۰^{e}

- حروف مختلف نشانگر اختلاف معنی دار بین داده‌ها می‌باشد ($p<0.05$). (Mean±SEM) (داده‌ها به صورت ستونی با هم مقایسه شدند).

جدول ٤. میانگین میزان بیان ژن *Bak* در بین گروه‌های تحت درمان نسبت به ژن رفرنس

گروه‌های	*Bak* (fold increases)
کنترل	۰/٤۸± ۰/۹۳ ^{a}
شم (نرمال سالین)	۰/٤۶±۱/۲۱ ^{a}
ژل رویال ۱۰۰	۰/٤۹±۱/۳٤ ^{a}
ژل رویال ۲۵۰	۰/٤۷±۱/۱۰ ^{a}
ژل رویال ۵۰۰	۰/٤۶± ۰/۸۵ ^{a}
سرب (۱۰۰۰ ppm)	۳/۳۱±۱/۹۲ ^{b}
سرب + ژل رویال ۱۰۰	۳/۰۵±۱/۶۹ ^{b}
سرب + ژل رویال ۲۵۰	۲/۰٤±۱/۸۱ ^{c}
سرب + ژل رویال ۵۰۰	۱/۲۲±۱/۳۳^{d}

حروف مختلف نشانگر اختلاف معنی دار بین داده‌ها می‌باشد ($p<0.05$)

بحث

امروزه قرارگرفتن در معرض مواد سمی عامل مهمی در ناباروری مردان است که می‌تواند به یک ماده محیطی مانند سرب منتسب شود [۸]. قرارگرفتن در معرض سرب به‌طور مستقیم بر پارامترهای تولیدمثلی تأثیرگذار است و باعث کاهش وزن بیضه و اپیدیدیم، تعداد سلول‌های لیدیگ و کاهش اسپرماتوژنز می‌شود [۳۳]. بنابراین در این مطالعه اثرات بهبوددهندگی ژل رویال بر کیفیت پارامترهای اسپرم در موش آزمایشگاهی تحت درمان با استات سرب مورد بررسی قرار گرفت.

در گزارشی گارسا و همکاران نشان دادند که در موش‌هایی که سرب دریافت کردند وزن بیضه‌ها، قطر لوله‌های منی‌ساز و تعداد اسپرم‌ها به طور چشمگیری کاهش یافت [٣٤]. همچنین در مطالعه‌ای دیگر به آب موش‌های صحرایی مدت ٤۵ روز استات سرب اضافه گردید و مشاهده شد وزن اندام‌های تناسلی، تعداد اسپرم، تحرک اسپرم و زنده‌مانی اسپرم کاهش یافت [۷]. مطالعات گذشته موید مطالعه حاضر

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]
[DOI: 10.52547/jarums.20.2.200]

است که در گروه‌های دریافت‌کننده سرب، پارامترهای اسپرم از جمله تعداد اسپرم، تحرک اسپرم و قابلیت زنده‌مانی کاهش می‌یابد و همچنین آسیب به DNA اسپرم افزایش می‌یابد.

از آنجایی‌که غشای پلاسمایی اسپرم‌ها دارای مقادیر بالایی اسید چرب غیر اشباع با پیوند دوگانه است و در سیتوپلاسم اسپرم میزان اندکی آنزیم‌های مهاری وجود دارد لذا اسپرم به افزایش میزان ROS در پلاسمای منی حساس است [۳۵]. بررسی‌ها نشان داده است که بین کیفیت پایین اسپرم و افزایش تولید ROS ارتباط مستقیمی وجود دارد [۳۶]. اثرات مثبت فعالیت‌های آنتی اکسیدانی ژل رویال در بیضه‌ها، کبد، کلیه‌ها، لوزالمعده، سلول‌های توموری، فعالیت جنسی در موش‌های صحرایی نر بالغ و مردان نابارور به‌طور گسترده‌ای شناخته شده است [۳۹-۳۷، ۱۸]. خاصیت آنتی اکسیدانی ژل رویال مربوط به عملکرد پروتیین‌های آن در مهار رادیکال‌های آزاد می‌باشد [۴۰]. بیش از ۲۹ بیوپپتید آنتی اکسیدانی از هیدرولیز پروتیین‌های ژل رویال حاصل شده است و مکانیسم‌های متعددی برای خاصیت آنتی اکسیدانی ژل رویال شناسایی شده است که از جمله این مکانیسم‌ها می‌توان به مهار رادیکال‌های هیدروکسیل، مهار رادیکال‌های سوپراکسید، شلاته کردن فلزات و پاکسازی پراکسید هیدروژن اشاره کرد [۴۱].

در مطالعه‌ای عبدالهادی و همکاران نشان دادند که در تنش اکسیداتیو ناشی از تجویز آلومینیوم ژل رویال اثر محافظت‌کننده دارد [۴۲]. همچنین در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که ژل رویال سبب بهبود پارامترهای منی در موش‌های درمان شده با اکسی‌متولون شده است [۴۳]. در مطالعه حاضر همانند مطالعات گذشته نشان داده شد که ژل رویال می‌تواند سبب بهبود پارامترهای اسپرم در موش‌هایی شود که تحت تاثیر سرب قرار گرفته بودند.

در مطالعه‌ای اثرات دوز پایین و متوسط استات سرب در موش صحرایی به مدت دو هفته مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که هر دو دوز مورد استفاده در مطالعه سبب کاهش تحرک اسپرم‌ها شده ولی میزان هورمون های LH و FSH تغییر نکردند ولی میزان تستوسترون افزایش یافت که نشانگر اثر انتخابی سرب بر روی بافت بیضه است [٤٤]. مطالعه حاضر نیز در راستای مطالعات گذشته نشان داد که در گروه سرب میزان هورمون‌های تستوسترون، LH و FSH کاهش معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌های تحت درمان از خود نشان داد. همچنین حسن و همکاران در مطالعه خود گزارش کردند ژل رویال باعث کاهش مالون دی آلدهید، اسپرم‌های غیرنرمال و بهبود تعداد اسپرم‌ها، درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها، سطح سرمی تستوسترون و گلوتایتون پروکسیداز شد [٤٣].

در مطالعات مختلف توانایی رادیکال‌های آزاد برای فسفوریلاسیون و تغییرات پروتئین‌های Bcl-2 به عنوان مارکرهای آپوپتوز نشان داده شده است [٤٥]. جئونگ[1] و همکاران اثر آلفاتوکوفرول در اسپرم گراز و اثرات آن بر پارامترهای اسپرم و میزان بیان ژن‌های آپوپتوز (*Bak* و*Bax*) و ژن‌های ضدآپوپتوز (*Bcl-2l* و *Bcl-xl*) را بررسی کردند. آنها نشان دادند که افزودن آلفاتوکوفرول در محیط اسپرم به عنوان یک آنتی اکسیدان، سبب کاهش بروز ژن‌های آپوپتوز بوسیله کاهش تکه تکه شدن DNA بعد از ذوب اسپرم می‌شود [٤٦]. نتایج حاصل از این مطالعه نیز تأیید کرد که بیان ژن *bak* در گروه‌های تحت درمان با استات سرب به‌دلیل افزایش میزان ROS در سطح سلول‌ها افزایش معنی‌داری یافت و در گروه‌هایی که ژل رویال استفاده شد بدلیل کاهش میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سطح سلول‌ها، ژل رویال توانست میزان بیان ژن آپوپتوز *bak* را کاهش دهد.

[1] Jeong

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOI: 10.52547/jarums.20.2.200]

نتیجه‌گیری

از بررسی یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که استات سرب موجب بروز استرس اکسیداتیو می‌گردد که این استرس‌های سمی بیوشیمیایی به واسطه ایجاد اختلال در دسترسی به آندروژن‌ها و متابولیسم انرژی، پی‌ریزی واکنش‌های التهابی و افزایش بیان ژن‌های آپوپتوز، موجب مسمومیت تولیدمثلی دستگاه تولیدمثلی موش آزمایشگاهی می‌گردند، حال آنکه این مطالعه نشان داد که ژل رویال به سبب دارابودن ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه و در نتیجه قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد اکسیژن و مهار افزایش بیان ژن آپوپتوز (*bak*)، قادر به ایجاد محافظت نسبی در برابر اثرات نامطلوب استات سرب در دستگاه تولیدمثلی موش آزمایشگاهی می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه بدلیل حمایت مالی مراتب تشکر و قدردانی را اعلام می‌دارند.

References

1- Hansen C, Luben TJ, Sacks JD, Olshan A, Jeffay S, Strader L, et al. The effect of ambient air pollution on sperm quality. *Environ* Health Perspect. 2010 Feb;118(2):203–209.
2- Toft G, Rignell-Hydbom A, Tyrkiel E, Shvets M, Giwercman A, Lindh CH, et al. Semen quality and exposure to persistent organochlorine pollutants. Epidemiology. 2006 Jul;17:450–58.
3- Nakada K, Sato A, Yoshida K, Morita T, Tanaka H, Inoue SI, et al. Mitochondria-related male infertility. Proc Natl Acad Sci. 2006 Oct;103(41):15148-53.
4- Meeker JD, Rossano MG, Protas B, Diamond MP, Puscheck E, Daly D, et al. Cadmium, lead, and other metals in relation to semen quality: human evidence for molybdenum as a male reproductive toxicant. Environ Health Perspect. 2008 Nov;116(11):1473–9.
5- Tališman S, Cvitković P, Jurasović J, Pizent A, Gavella M, Ročić B. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. Environ Health Perspect. 2000 Jan;108(1):45–53.
6- Jana K, Samanta PK, De DK. Nicotine diminishes testicular gametogenesis, steroidogenesis, and steroidogenic acute regulatory protein expression in adult albino rats: possible influence on pituitary gonadotropins and alteration of testicular antioxidant status. Toxicol Sci. 2010 Aug;116(2):647–59.
7- Anjum MR, Sainath SB, Suneetha Y, Reddy PS. Lead acetate induced reproductive and paternal mediated developmental toxicity in rats. Ecotoxicol Environ Saf. 2011 Nov;74(4):793–9.
8- Vigeh M, Smith DR, Hsu P-C. How does lead induce male infertility? Iran J Reprod Med. 2011 Winter;9(1):1.
9- Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas Jr AJ, 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 Sep;80(3):531-35.
10- Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ, et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. Hum Reprod. 2004 Jan;19(1):129-38.
11- Golshan-Iranpour F, Emami E. The effects of lead on motility, viability and DNA denaturation of cauda epididymal spermatozoa of mouse. J Shahrekord Univ Med Sci. 2011 Oct;13(4):1-8. [Full text in Persian]
12- 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 Nov;10(11):825-34.
13- Wang J, Yang Z, Lin L, Zhao Z, Liu Z, Liu X. Protective effect of naringenin against lead-induced oxidative stress in rats. Biol Trace Elem Res. 2012;146(3):354–9.
14- Xia D, Yu X, Liao S, Shao Q, Mou H, Ma W. Protective effect of *Smilax glabra* extract against lead-induced oxidative stress in rats. J Ethnopharmacol. 2010 Jul;130(2):414–20.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOI: 10.52547/jarums.20.2.200]

15- Balercia G, Regoli F, Armeni T, Koverech A, Mantero F, Boscaro M. Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia. Fertil Steril. 2005 Sept;84(3):662–71.
16- Bărnuţiu LI, Mărghitaş L Al, Dezmirean DS, Mihai CM, Bobiş O. Chemical composition and antimicrobial activity of royal jelly-review. Sci Pap Anim Sci Biotechnol. 2011 Sep;44(2):67–72.
17- Çavuşoğlu K, Yapar K, Yalçin E. Royal jelly (honey bee) is a potential antioxidant against cadmium-induced genotoxicity and oxidative stress in albino mice. J Med Food. 2009 Dec;12(6):1286–92.
18- El-Nekeety AA, El-Kholy W, Abbas NF, Ebaid A, Amra HA, Abdel-Wahhab MA. Efficacy of royal jelly against the oxidative stress of fumonisin in rats. Toxicon. 2007 Mar;50(2):256–69.
19- Nakajima Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Mishima S, Hara H. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. BMC Complement Altern Med. 2009 Feb;9(1):4.
20- Ghanbari E, Nejati V, Azadbakht M. Protective effect of royal jelly against renal damage in streptozotocin induced diabetic rats. Iran J Toxicol. 2015 Spring; 9(28): 1258-63.
21- Silici S, Ekmekcioglu O, Kanbur M, Deniz K. The protective effect of royal jelly against cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. World J Urol. 2011 Feb;29(1):127–32.
22- Asadpour R, Azari M, Hejazi M, Tayefi H, Zaboli N. Protective effects of garlic aquous extract (Allium sativum), vitamin E, and N-acetylcysteine on reproductive quality of male rats exposed to lead. Vet Res Forum. 2013 Jan: 251-7.
23- Seven I, Şimşek Üg, Gökçe Z, Seven Pt, Arslan A, Yilmaz Ö. The effects of royal jelly on performance and fatty acid profiles of different tissues in quail (Coturnix coturnix japonica) reared under high stocking density. Turkish J Vet Anim Sci. 2014 June;38(3):271–7.
24- Nowrouzi F, Azadbakht M, Kalehoei E, Modarresi M. Protective effect of *Rosa Canina* extract against doxorubicin-induced testicular toxicity in mice. Brazilian Arch Biol Technol. 2019 June;62:e19180017.
25- 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 Spring; 8(2): 97–104.
26- Jalali AS, Najafi G, Hosseinchi M, Sedighnia A. Royal Jelly alleviates sperm toxicity and improves in vitro fertilization outcome in Stanozolol-treated mice. Iran J Reprod Med. 2015 Jan;13(1):15.
27- Selvakumar E, Prahalathan C, Sudharsan PT, Varalakshmi P. Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. Toxicology. 2006 Jan;217(1):71–78.
28- Lu J-C, Huang Y-F, Lü N-Q. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen: its applicability to andrology laboratories in China. Zhonghua nan ke xue. 2010 Oct;16(10):867–71.
29- Wyrobek AJ, Gordon LA, Burkhart JG, Francis MW, Kapp Jr RW, Letz G, et al. An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals: A report of the US environmental protection agency gene-tox program. Mutat Res Genet Toxicol. 1983 May;115(1):1–72.
30- Talebi AR, Sarcheshmeh AA, Khalili MA, Tabibnejad N. Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. Alcohol. 2011 Jun;45(4):403–9.
31- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem. 1996 Jul;239(1):70–6.
32- Park MR, Gurunathan S, Choi YJ, Kwon DN, Han JW, Cho SG, et al. Chitosan nanoparticles cause pre-and postimplantation embryo complications in mice. Biol Reprod. 2013 Apr;88(4):81–8.
33- Mathur PP, Chattopadhyay S. Involvement of lysosomal enzymes in flutamide-induced stimulation of rat testis. Andrologia. 1982 Mar-Apr;14(2):171–76.
34- Graça A, Ramalho-Santos J, de Lourdes Pereira M. Effect of lead chloride on spermatogenesis and sperm parameters in mice. Asian J Androl. 2004 Sep;6(3):237–41.
35- Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR. Antioxidant strategies in the epididymis. Mol Cell Endocrinol.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOI: 10.52547/jarums.20.2.200]

2004 Mar;216(1–2):31–39.
36- Gomes E, Irvine Ds, Aitken Rj. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relashionships with semen quality and sperm function. Int J Andrology. 1998 Apr;21:81–94.
37- Amirshahi T, Nejati V, Najafi G. Biochemical and histological evaluation of protective effect of royal jelly on pancreas-induced oxidative stress in male rat pancreas. J Maz Univ Med Sci. 2013 Mar;23(107):107–115. [Full text in Persian]
38- Shirzad M, Kordyazdi R, Shahinfard N, Nikokar M. Does royal jelly affect tumor cells? J HerbMed Pharmacol. 2013 Dec;2(2).
39- Ahmadnia H, Sharifi N, Alizadeh S, Roohani Z, Kamalati A, Marjan S. Wonderful effects of royal jelly on treatment of male-factor related infertility. Austin J Reprod Med Infertil. 2015 Aug;2(6):1031.
40- Nagai T, Inoue R. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. Food Chem. 2004 Jan;84(2):181–6.
41- Guo H, Kouzuma Y, Yonekura M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. Food Chem. 2009 Mar;113(1):238–45.
42- Hadi AHA, Deaibil HB. Effect of royal jelly on sperm parameters in aluminum-treated male rats. J Appl Tissue Eng. 2020;7(1). In Press.
43- Najafi G, Nejati V, Shalizar Jalali A, Zahmatkesh E. Protective role of royal jelly in oxymetholone-induced oxidative injury in mouse testis. Iran J Toxicol. 2014 Summer;8(25):1073–80.
44- Allouche L, Hamadouche M, Touabti A. Chronic effects of low lead levels on sperm quality, gonadotropins and testosterone in albino rats. Exp Toxicol Pathol. 2009 Feb;61(5):503–10.
45- K Kontos C, Christodoulou MI, Scorilas A. Apoptosis-related BCL2-family members: key players in chemotherapy. Anti-Cancer Agents Med Chem (Formerly Curr Med Chem Agents). 2014 Sep;14(3):353–74.
46- Jeong YJ, Kim MK, Song HJ, Kang EJ, Ock SA, Mohana Kumar B, et al. Effect of α-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. Cryobiology. 2009 Apr;58(2):181–9.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

[DOI: 10.52547/jarums.20.2.200]