

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

فرنام آزاد (MSc)^{*}، وحید نجاتی (PhD)^۱، علی شالیزار جلالی (PhD)^۲، غلامرضا نجفی (PhD)^۳، فاطمه رحمانی (PhD)^۱

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

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

خلاصہ

سابقه و هدف: نیکوتین به عنوان ترکیب دارویی، تاثیر نامطلوبی روی دستگاه تولیدمثلی نر دارد. از آنجائیکه ژل رویال با خاصیت آنتی اکسیدانتی می تواند تنش اکسیداتیو را تعدیل کند. این مطالعه به منظور بررسی محافظتی ژل رویال روی بافت بیضه و فراسنجه های اسپرمی در موش های تحت تیمار با نیکوتین انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، ۳۶ موش نر بالغ به صورت تصادفی به شش گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه اول سرم فیزیولوژی، گروه دوم ژل رویال با دوز ۱۰۰ mg/kg/day و گروه های سوم و چهارم به ترتیب نیکوتین را با دوزهای ۵۰ mg/kg/day و ۱ mg/kg/day دریافت کردند. گروه های پنجم و ششم به همراه نیکوتین به ترتیب دوزهای ۵ mg/kg/day و ۱ mg/kg/day، ژل رویال دریافت نمودند. متعاقب توزین و تشریح، بیضه های چپ برای مطالعات بافت شناسی و اسپرم های ایدیدیم، چپ جهت ارزیابی های اسپرمی، استفاده شدند.

یافته ها: نیکوتین موجب کاهش معنی دار سلول های اسپرماتوگونی ($۰/۵ \pm ۲۲/۴۰$ و $۱۲/۱ \pm ۳۱/۸۰$) و افزایش معنی دار اسپرم های غیرمتحرک ($۰/۵ \pm ۲۲/۹۲$ و $۳۶/۴۰ \pm ۳۱/۸۰$)، مرده ($۰/۵ \pm ۱۹/۰۶$ و $۱۴/۱ \pm ۲۸/۳۸$) و غیرطبیعی ($۰/۵ \pm ۱۷/۰۷$ و $۲۵/۱ \pm ۳۸/۱۴$) تجویز همزمان ژل رویال به طور قابل ملاحظه ای تعداد سلول های اسپرماتوگونی ($۰/۵ \pm ۲۷/۳۲$ و $۱۲/۱ \pm ۲۵/۳۲$)، میزان اسپرم های غیرمتحرک ($۰/۵ \pm ۲۷/۳۲$ و $۱۲/۱ \pm ۲۵/۳۲$)، مرده ($۰/۵ \pm ۲۷/۳۲$ و $۱۲/۱ \pm ۲۵/۳۲$) و غیرطبیعی ($۰/۵ \pm ۲۷/۳۲$ و $۱۲/۱ \pm ۲۵/۳۲$) را در مقایسه با گروه های تحت درمان با نیکوتین بهبود بخشید.

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

مقدمه

مصرف سیگار به عنوان یکی از مهم‌ترین معضلات سلامت عمومی، می‌تواند اثرات سوء بر باروری زنان و مردان داشته باشد (۱و۲). نیکوتین به عنوان یک آلکالوئید بسیار فرار از اجزا مهم دود سیگار، قادر به ایجاد آثار زیان آور در بدن می‌باشد (۳). شواهد روشنی وجود دارد که نیکوتین موجب افزایش تنش اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیداتی در دستگاه تولیدمثلی نر می‌گردد (۴). از طرفی اسپرماتوزوآ به دلیل دارا بودن مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع در غشای پلاسمایی و میزان ناچیز آنتی اکسیدانت‌های سیتوپلاسمی، مستعد آسیب اکسیداتیو می‌باشد (۵). مطالعات نشان داده که تجویز نیکوتین در حیوانات آزمایشگاهی موجب کاهش وزن بیضه، افزایش بد شکلی‌های اسپرمی و آتروفی غدد ضمیمه، اپی دیدیم و مجرای دفران می‌گردد (۶). از طرف دیگر، ثابت شده است که دوز و زمان قرار گرفتن در معرض نیکوتین در موش‌های صحرایی با تغییرات مخرب در بافت بیضه ارتباط مستقیم دارد (۷). نیکوتین به راحتی، از غشای سلول‌های بدن عبور می‌کند و قابلیت واکنش با برخی از اجزاء

درون سلولی همچون پروتئین توپولین در سیتوپلاسم سلول‌های در حال تقسیم نظیر سلول‌های زایای جنسی را دارد و بدین ترتیب موجب اختلال در تقسیم سلول می‌گردد (۸). همچنین، گزارشات نشان می‌دهد که نیکوتین موجب تغییرات دژنراتیو در لوله‌های اسپرم ساز، کاهش اسپرماٹوزن و اختلال در عملکرد بیضه می‌شود (۹). مصرف نیکوتین می‌تواند به غشای سلولی و DNA اسپرم آسیب برساند و باعث القای آپوپتوز در سلول‌های بیضه شود (۱۰). همچنین مطالعات نشان می‌دهد تجویز نیکوتین در موش‌های صحرایی باعث ضخیم شدن تونیکا پروپریا به واسطه ایجاد افزایش در رشته‌های کلاژن لایه بازال، تخریب اتصالات بین سلولی سلول‌های سرتولی، ناهنجاری‌های کروموزومی، شکل‌گیری سلول‌های سرتولی با میتوکندری‌های چندانکلی، سلول‌های زایای دژنره شده، تجمع بیش از حد قطرات چربی در سیتوپلاسم اسپرم و ناهنجاری‌های مورفولوژیک در اسپرم می‌شود (۱۱). از سوی دیگر، سمیت نیکوتین ممکن است به علت تغییر در نسبت رشته‌های کلاژن و سلول‌های انقباض، میوتید باشد که ممکن است از انتشار

این مقاله حاصل پایان نامه فرنام آزاد دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بافت شناسی و جنین شناسی دانشگاه ارومیه می باشد.

* مسئول، مقاله: فرنام آزاد

آدرس: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، تلفن: ۳۲۷۵۵۲۹۵-۴۴.

E-mail: farnam.azad@hotmail.com

گرفتند. گروه اول به عنوان گروه شاهد 0.20 ml سالیन نرمال به صورت خوراکی دریافت کردند. گروه دوم فقط 0.20 ml ژل رویال با دوز 100 mg/kg/day به صورت خوراکی دریافت کردند. گروه سوم 0.2 ml نیکوتین با دوز 0.50 mg/kg/day به صورت خوراکی دریافت کردند. گروه چهارم 0.2 ml نیکوتین با دوز 1 mg/kg/day به صورت خوراکی دریافت کردند. گروه پنجم 0.2 ml نیکوتین با دوز 0.5 mg/kg/day و 0.2 ml ژل رویال با دوز 100 mg/kg/day به صورت خوراکی دریافت کردند.

در گروه ششم 0.2 ml نیکوتین با دوز 1 mg/kg/day و 0.2 ml ژل رویال با دوز 100 mg/kg/day به صورت خوراکی تجویز شد. در پایان دوره تیمار، پس از گذشت ۲۴ ساعت از آخرین تیمار، تمامی موش های موجود در شش گروه ذکر شده پس از وزن کشی با دریافت کتامین بیهوش و متعاقباً آسان کشی شدند. به منظور ارزیابی خصوصیات اسپرم، متعاقب کالبدگشایی، ابتدا اپیدیدیم زیر لوپ با بزرگنمایی ۲۰ برابر از بافت بیضه جدا و بافت های اطراف آن تمیز گردید. بلافاصله دم اپیدیدیم درون پتری دیش های حاوی یک میلی لیتر محیط کشت HTF (Human Tubal fluid) قرار گرفت. سپس، دم اپیدیدیم در داخل محیط کشت به قطعات کوچک خرد شد و به مدت ۲۰ دقیقه در درون محیط کشت در انکوباتور باقی ماند تا امکان خروج اسپرمها از اپیدیدیم فراهم آید. در نهایت، سوسپانسیون حاوی اسپرم با استفاده از محیط کشت به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق گردید. تمام وسایل مورد استفاده و محیط کشت قبل از مصرف جهت جلوگیری از ایجاد شوک حرارتی و آسیب دیدن اسپرمها، در انکوباتور 37°C درجه قرار داده شدند (۱۹). جهت تعیین میزان تحرک اسپرمها، یک قطره از محلول رقیق شده فوق بر روی لام میکروسکوپی قرار داده شد و ۱۰ عدد میدان دید میکروسکوپی با درشت نمایی ۴۰۰ برابر مورد بررسی قرار گرفت.

سپس، میانگین کل اسپرمهای غیرمتحرک در این ۱۰ میدان دید به عنوان درصد تحرک ثبت گردید (۱۹). جهت ارزیابی تعداد اسپرمها با استفاده از هموسیتمتر، ۱۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده اسپرم بر روی هموسیتمتر قرار داده شد و به مدت ۵ دقیقه بدون حرکت باقی ماند تا تحرک اسپرمها کاهش یابد. تعداد اسپرمها در هر میلی لیتر با استفاده از فرمول $d \times 50000 \times n$ و توسط میکروسکوپ نوری با درشت نمایی ۴۰۰ برابر محاسبه گردید، که n تعداد اسپرمهای شمارش شده در پنج مربع هموسیتمتر و d، عکس رقت سوسپانسیون حاوی اسپرم می باشد (۱۹). به منظور ارزیابی درصد اسپرمهای مرده و نیز اسپرمهای غیرطبیعی از لحاظ مورفولوژی، رنگ آمیزی انوزین-نکروزین مورد استفاده قرار گرفت. در این روش تشخیص اسپرمهای زنده از اسپرمهای مرده بر این اصل استوار است که در اثر آسیب دیدن غشاء پلاسمایی، اسپرمها در برابر رنگ مذکور نفوذپذیر می گردند. بنابراین، آن دسته از اسپرمهایی که هر یک از قطعات سر، گردن و یا دم آنها رنگ گرفته باشد، به عنوان اسپرمهای مرده در نظر گرفته می شوند. اسپرمهایی نیز که دارای بقایای سیتوپلاسمی و سایر اختلالات مورفولوژیک بودند، به عنوان اسپرمهای غیرطبیعی در نظر گرفته شدند (شکل ۱). تعداد ۲۰۰ اسپرم برای هر نمونه با درشت نمایی ۴۰۰ برابر مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل در قالب درصد بیان شدند (۱۹). پس از کالبدگشایی، بیضه حیوانات توسط ترازوی آزمایشگاهی با دقت (0.001 gr) اندازه گیری و نمونه های بافتی بیضه با رعایت اصول استریل برداشته شده و بیضه های سمت چپ جهت ثبوت به محلول ثبوتی فرمالین ۱۰٪ منتقل شدند (۲۰).

مناسب اسپرم از اپی تلیوم زایا به حفره میانی لوله های اسپرم ساز جلوگیری کند (۱۱ و ۱۲). همچنین گزارشات پیشین نشان داده است که تجویز نیکوتین علاوه بر کاهش تعداد اسپرم، تحرک و زنده مانی اسپرمها موجب افزایش میزان بد شکلی و آپوتوز اسپرمی می شود (۱۳). ژل رویال به عنوان غذای ملکه زنبورهای عسل شناخته می شود و توسط لاروهای جوان و ملکه مورد استفاده قرار می گیرد. این ماده نقش مهمی در تغذیه ملکه دارد و از غدد زیرحلقی و تحتفکی زنبورهای کارگر جوان ترشح می شود. ژل رویال ماده ای به رنگ سفید شیری است که دارای بوی تند و مزه ای میوه ای و ارزش غذایی فراوان است. این ژل عامل بزرگتر بودن جنه، قدرت باروری زیاد و بیشتر بودن طول عمر ملکه است (۱۴). ژل رویال به عنوان یک سوپر غذا متشکل از ۶۶٪ آب، ۱۵٪ شکر، ۵٪ لیپید و ۱۳٪ از پروتئین ها، اسیدهای آمینه ضروری و ویتامین ها می باشد (۱۵).

همچنین ژل رویال دارای انواع فعالیت های بیولوژیکی در سلول ها و بافتهای مختلف می باشد که اثرات تحریکی بر اندامهای مختلف بدن داشته و می تواند عملکرد آنها را در برابر تنش اکسیداتیو بهبود بخشد (۱۶ و ۱۷). علاوه بر این، ژل رویال به عنوان یک محرک کمک کننده به حفظ فعالیت منظم و طبیعی هورمون ها شناخته می شود که در درمان مشکلات از کار افتادگی جنسی مزمن ارزشمند است (۱۸). تاکنون گزارشی دال بر اثرات زیان بخش ژل رویال بر دستگاه های زیستی وجود ندارد و با توجه به خواص آنتی اکسیدانتی این ماده در برابر تنش اکسیداتیو، اثرات تجویز خوراکی ژل رویال بر ساختار بافتی بیضه و فراسنجه های اسپرمی در موش های تحت درمان با نیکوتین مورد بررسی قرار نگرفته است. لذا، هدف از این مطالعه بررسی اثرات محافظتی احتمالی ژل رویال بر روی وزن بدن و بیضه، ساختار بافت بیضه و میزان تحرک، قابلیت زنده مانی و ریخت شناسی اسپرم های اپیدیدی در برابر سمیت های تولیدمثلی نیکوتین در موش های سفید کوچک آزمایشگاهی نژاد Balb/c می باشد.

مواد و روش ها

محلول نیکوتین ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2$) از شرکت سیگما (Sigma-Germany) خریداری شد و به وسیله سالین نرمال دو دوز 0.5 و 1 میلی گرم بر کیلوگرم از آن تهیه گردید. ژل رویال مورد استفاده در این مطالعه از کندوهای زنبورستان های شهرستان ارومیه در شهریور ماه سال ۱۳۹۵ تهیه شد و پس از تایید توسط هیئت علمی گروه بهداشت و مواد غذایی دانشکده دامپزشکی در دوز 100 میلی گرم بر کیلوگرم تهیه گردید. در این مطالعه تجربی، تعداد ۳۶ سر موش نر بالغ نژاد Balb/c با سن تقریبی 60 ± 5 از خانه حیوانات دانشکده علوم دانشگاه ارومیه خریداری شد و در اتاقی با دمای محیطی 24 ± 2 درجه سانتی گراد و رطوبت 75 ± 5 درصد، چرخه روشنایی به تاریکی $12:12$ ساعت و در قفس استیلی با اندازه 35 در 55 سانتی متر نگهداری شدند. آب آشامیدنی حیوانات در تمام طول آزمایش آب لوله کشی شهری و تغذیه به صورت غذای مخصوص موش (پلیت) بود.

در همه مراحل اجرای این پژوهش، قواعد مربوط به اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی (دستورالعمل کمیسیون اروپا (86/609/EEC)) رعایت گردید. برای سازگاری حیوانات با محیط، به مدت ۲ هفته در محیط آزمایشگاه و درون قفس نگهداری شدند. پس از این دوره حیوانات به صورت تصادفی به طور مساوی (۶ حیوان در هر گروه) به ۶ گروه تقسیم شدند و پس از ۳۵ روز مورد بررسی قرار

یافته ها

وزن بدن و بیضه: مطالعه حاضر نشان داد که میانگین وزن بدن و بیضه حیوانات در گروه‌های تحت درمان با نیکوتین نسبت به گروه شاهد و ژل رویال به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) کاهش یافت. حال آن که در گروه‌های دریافت‌کننده ژل رویال به همراه نیکوتین در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده نیکوتین به تنهایی افزایش معنی‌داری ($p < 0.05$) در وزن بدن و بیضه مشاهده گردید (جدول ۲).

ارزیابی خصوصیات اسپرم‌های اپیدیدیمی: نتایج مربوط به ارزیابی فراسنجه‌های اسپرمی نشان داد که تجویز نیکوتین به صورت وابسته به دوز باعث کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) میانگین تعداد اسپرم و افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) درصد اسپرم مرده، بی‌حرکت و اسپرم‌های با مورفولوژی غیر طبیعی نسبت به گروه شاهد و ژل رویال می‌شود، از طرف دیگر تجویز همزمان ژل رویال با نیکوتین افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) تعداد اسپرم و کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) درصد اسپرم مرده، بی‌حرکت و اسپرم‌های با مورفولوژی غیر طبیعی را نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده نیکوتین به تنهایی، موجب گردید (نمودارهای ۱ و ۲).

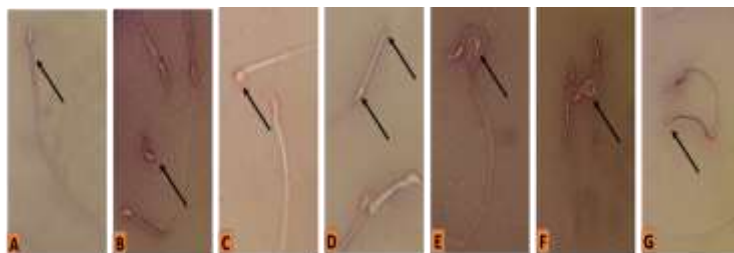
شمارش سلول‌های زایا و سرتولی بیضه: نتایج مربوط به شمارش سلول‌های زایا و سرتولی نیز نشان داد که میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و سلول‌های سرتولی در گروه‌های دریافت‌کننده نیکوتین در هر دو دوز دارای اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) با گروه شاهد می‌باشد (جدول ۳). از طرف دیگر تجویز همزمان ژل رویال به همراه نیکوتین، افزایش معنی‌داری ($p < 0.05$) را در تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک و سرتولی نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده نیکوتین به تنهایی، موجب گردید (جدول ۳).

ارزیابی اسپرماتوژنز: نتایج مربوط به ارزیابی اسپرماتوژنز مشخص نمود که در گروه‌های دریافت‌کننده نیکوتین در هر دو دوز کاهش معنی‌داری ($p < 0.05$) در شاخص جانسن نسبت به گروه‌های شاهد و ژل رویال وجود دارد. از سوی دیگر، در گروه‌های دریافت‌کننده ژل رویال به همراه نیکوتین بهبود معنی‌داری ($p < 0.05$) در پیشرفت اسپرماتوژنز در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده نیکوتین به تنهایی، مشاهده گردید (نمودار ۳).

ارزیابی مورفومتریک لوله‌های اسپرم‌ساز: در ارزیابی‌های مورفومتریک، ضخامت اپی‌تلیوم زایا و قطر لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه در گروه‌های دریافت‌کننده نیکوتین به صورت وابسته به دوز در مقایسه با گروه‌های شاهد و ژل رویال به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) کاهش نشان داد. در حالی که در گروه‌های نیکوتین+ژل رویال در مقایسه با گروه‌های تحت درمان با نیکوتین افزایش معنی‌داری ($p < 0.05$) در فراسنجه‌های بافت‌شناسی فوق مشاهده گردید (جدول ۴).

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

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



شکل ۱. برخی از ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم در گروه‌های تحت تیمار با نیکوتین A: اسپرم طبیعی B: بدون دم C: سر دایره‌ای شکل D: بدون سر و حاوی قطره سیتوپلاسمی پروکسیمال E: سر خمیده F: دم مارپیچ G: دم گره خورده. رنگ آمیزی اتوزین-نگروزین. بزرگنمایی $\times 400$.

نمونه‌های بافتی بیضه چپ پس از ثبوت به همراه مشخصات درون ظروف مخصوص قرار گرفتند و متعاقب طی مراحل پاساژ بافتی، با استفاده از پارافین مذاب قالب‌گیری شدند. سپس، با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر از قالب‌های پارافینی تهیه گردید و در نهایت رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین-اتوزین و پرویدیک اسید شیف جهت رنگ‌آمیزی نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در مقاطع بافتی تهیه شده علاوه بر شمارش سلول‌های اسپرماتوژنیک و سرتولی بر اساس مورفولوژی سلول‌ها (۲۱)، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخامت اپی‌تلیوم زایا نیز با کمک عدسی چشمی مدرج اندازه‌گیری و ثبت شد. جهت شمارش سلول‌ها در هر گروه تعداد ۱۰ برش به صورت تصادفی انتخاب شد و در هر برش تعداد ۱۰ لوله اسپرم‌ساز، به صورت تصادفی اندازه‌گیری شده و سلول‌ها شمارش شدند. همچنین، برای ارزیابی اسپرماتوژنز از شاخص جانسن استفاده شد. برای این منظور از مقطع عرضی ۱۰۰ لوله اسپرم‌ساز در هر حیوان استفاده شد و به هر لوله بر اساس الگوی دسته‌بندی جانسن (جدول ۱) نمره ۱ تا ۱۰ تعلق گرفت (۲۲). مقاطع بافتی همچنین به منظور مطالعه ترکیبات کربوهیدراتی، به وسیله روش پرویدیک-اسید-شیف (PAS) رنگ آمیزی شدند که در این روش واکنش پاس مثبت به رنگ قرمز قابل مشاهده می‌باشد (۲۳). داده‌های این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ آزمون آماری از آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون توکی تجزیه و تحلیل شدند و $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول ۱. ارزیابی اسپرماتوژنز براساس شاخص جانسن

نمره	ظاهر هیستوپاتولوژی
۱۰	اسپرماتوژنسیس کامل در تمام توبول‌ها
۹	تعداد زیادی اسپرماتید دیرس، توبولار اپی‌تلیوم نامنظم
۸	تعداد کمی اسپرماتید دیرس
۷	بدون اسپرماتید دیرس، تعداد زیادی اسپرماتید زودرس
۶	بدون اسپرماتید دیرس، توقف در مرحله اسپرماتید زودرس
۵	تعداد زیادی اسپرماتوسیت بدون سلول‌های اسپرماتید
۴	توقف در اسپرماتوسیت اولیه
۳	فقط سلول‌های اسپرماتوگونی
۲	فقط سلول سرتولی
۱	توبولار اسکروسیس

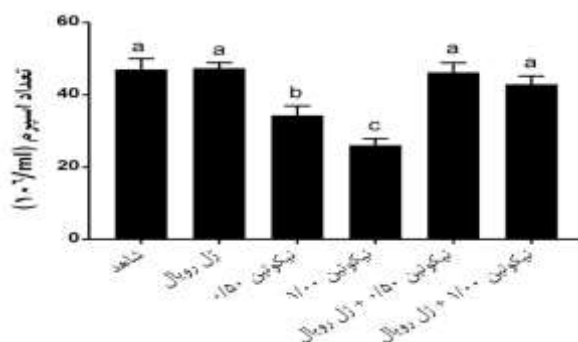
حالی که در گروه‌های دریافت کننده نیکوتین+ژل رویال میزان واکنش به رنگ-آمیازی PAS در سلولهای لیدیک و اپی‌تلیوم زایای لوله‌های اسپرم‌ساز تقریباً مشابه گروه شاهد بود (شکل ۲).

و اپی‌تلیوم زایای لوله‌های اسپرم‌ساز نیز واجد واکنش PAS مثبت بودند (شکل ۲). در گروه‌های تحت درمان با نیکوتین واکنش به رنگ‌آمیازی PAS در سلول‌های لیدیک و اپی‌تلیوم زایای لوله‌های اسپرم‌ساز به طور مشخصی کاهش نشان داد. در

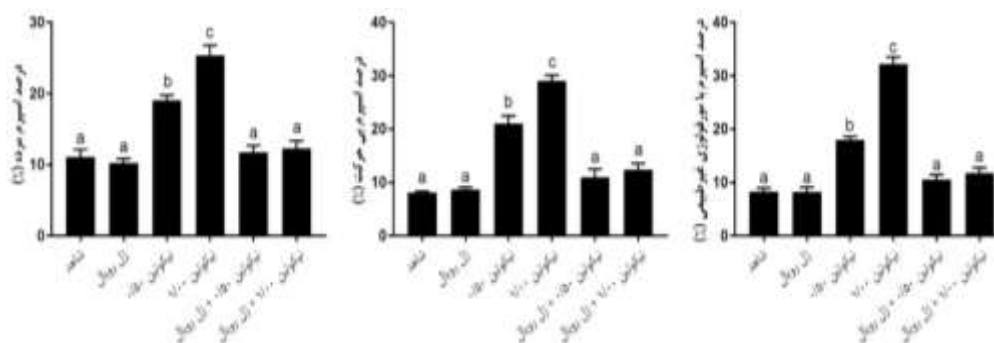
جدول ۲. مقایسه وزن بدن و بیضه موش‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی

گروه‌ها	وزن بدن قبل از دوره تیمار (گرم)	وزن بدن بعد از پایان دوره تیمار (گرم)	وزن بیضه (میلی گرم)
Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	
شاهد	۳۱/۶۹±۱/۲۵ ^a	۳۲/۹۸±۲/۴۸ ^a	۹۷/۶۴±۳/۱۱ ^a
ژل رویال	۳۱/۱۲±۱/۱۶ ^a	۳۲/۰۰±۲/۶۹ ^a	۹۷/۵۱±۴/۵۹ ^a
نیکوتین ۰/۵۰	۳۲/۰۱±۱/۴۲ ^a	۳۷/۴۶±۲/۶۹ ^b	۷۹/۴۲±۳/۴۸ ^b
نیکوتین ۱/۰۰	۳۱/۰۹±۱/۰۹ ^a	۲۵/۳۸±۲/۵۱ ^b	۶۸/۱۲±۲/۹۹ ^c
نیکوتین ۰/۵۰+ژل رویال	۳۱/۷۴±۱/۰۶ ^a	۳۱/۴۴±۱/۶۹ ^a	۹۶/۶۹±۴/۵۱ ^a
نیکوتین ۱/۰۰+ژل رویال	۳۱/۷۴±۱/۵۷ ^a	۳۲/۶۶±۱/۳۰ ^a	۹۴/۵۸±۲/۲۷ ^a

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($p < 0.05$).

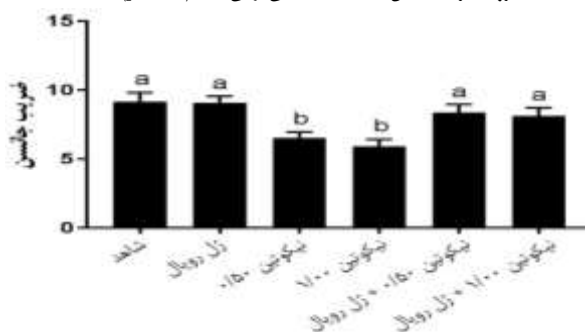


نمودار ۱. مقایسه تعداد اسپرم در گروه‌های مختلف آزمایشی.



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

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($p < 0.05$).



نمودار ۳. مقایسه میانگین ضریب جانسن در گروه‌های مختلف آزمایشی

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($p < 0.05$).

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

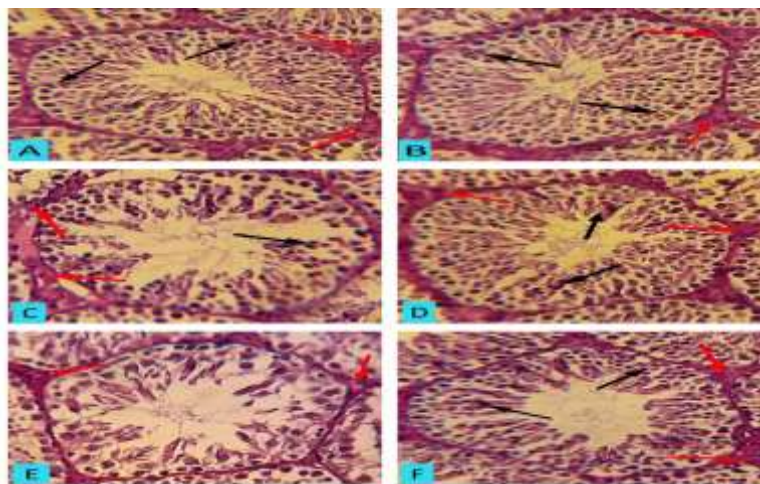
گروه	متغیر	اسپرماتوگونی Mean±SD	اسپرماتوسیت Mean±SD	اسپرماتید Mean±SD	سرتولی Mean±SD
شاهد		۴۸/۶۷±۴/۲۱ ^a	۵۰/۱۹±۳/۹۹ ^a	۱۰۶/۷۸±۱۴/۶۸ ^a	۱۶/۸۰±۱/۳۷ ^a
ژل رویال		۴۸/۹۴±۴/۲۰ ^a	۴۸/۷۹±۲/۴۱ ^a	۱۱۲/۸۴±۲۸/۳۵ ^a	۱۷/۳۳±۱/۷۱ ^a
نیکوتین ۰/۵۰		۳۶/۴۰±۲/۹۲ ^b	۳۹/۲۳±۲/۰۷ ^b	۷۰/۶۹±۹/۰۴ ^b	۱۳/۴۸±۱/۳۷ ^b
نیکوتین ۱		۳۱/۸۰±۵/۱۲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

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($p < 0.05$).

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

گروه	متغیر	قطر لوله‌های اسپرم ساز (میکرومتر) Mean±SD	ضخامت اپی تلیوم زایا (میکرومتر) Mean±SD
شاهد		۱۵۰/۰۲±۳/۸۷ ^a	۳۸/۹۳±۳/۶۵ ^a
ژل رویال		۱۵۳/۵۸±۵/۰۶ ^a	۳۹/۰۳±۴/۷۶ ^a
نیکوتین ۰/۵۰		۱۲۶/۸۸±۴/۹۱ ^b	۲۶/۳۹±۲/۸۸ ^b
نیکوتین ۱		۶۰/۴۴±۶/۴۴ ^b	۲۲/۴۴±۲/۷۰ ^b
نیکوتین ۰/۵۰+ژل رویال		۱۴۴/۴۲±۵/۴۸ ^a	۳۸/۳۱± ۳/۹۶ ^a
نیکوتین ۱+ژل رویال		۱۳۷/۸۴±۵/۱۶ ^a	۳۸/۱۸±۴/۲۸ ^a

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($p < 0.05$).



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

بحث و نتیجه گیری

نیکوتین به علت نقش مهاری در مصرف غذا و جلوگیری از سنتز پروتئین و نیز کاهش توده پروتئینی و چربی موجب کاهش وزن بدن می‌شود (۲۵). همچنین، نتایج بررسی حاضر نشان داد که تجویز نیکوتین باعث کاهش وزن نسبی بیضه می‌شود که شاخص مهمی جهت ارزیابی سمیت‌های تولیدمثلی در حیوانات نر به شمار می‌آید. بررسی‌ها در این مطالعه نشان داد که نیکوتین در هر دو دوز سبب کاهش کیفیت و کمیت اسپرم‌های اپیدیدیمی می‌شود. مطالعه حاضر همسو با مطالعات پیشین (۲۶ و ۲۷) نشان داد که نیکوتین سبب کاهش معنی‌دار تعداد اسپرم

در این مطالعه تجویز ژل رویال در حیوانات تحت درمان با نیکوتین در هر دو دوز، موجب بهبود آسیب‌های بیضه و ناهنجاری‌های اسپرمی در مقایسه با موش‌های دریافت‌کننده نیکوتین به تنهایی، شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که کاهش معنی‌داری در وزن موش‌هایی که نیکوتین دریافت کرده بودند، وجود دارد که با مطالعات پیشین در حیوانات آزمایشگاهی در رابطه با نقش نیکوتین در کاهش قابل ملاحظه وزن بدن، مطابقت دارد (۲۴). چنین به نظر می‌رسد که

تلیوم زایای لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه گروه‌های دریافت کننده نیکوتین واکنش ضعیفی به رنگ‌آمیزی PAS نشان داد که این امر می‌تواند نشان‌دهنده اختلال در نقل و انتقال گلوکز باشد (۳۴). نتایج بررسی‌های این مطالعه همچنین نشان داد که ژل رویال می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت در مقابل اثرات سمی نیکوتین در دستگاه تولیدمثل نقش محافظتی قابل‌توجهی داشته باشد، همچنان‌که گزارشات پیشین نیز از نقش محافظتی چشمگیر این ماده در برابر اختلالات تولیدمثلی ناشی از بلئومایسین در موش‌های صحرایی نر و نیز آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از اکسی‌متولون در بافت بیضه موش حکایت دارند (۳۶ و ۳۵).

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

تقدیر و تشکر

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

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

در مطالعه حاضر شمارش سلول‌های اسپرماتوژنیک بافت بیضه موش‌های تحت تیمار با نیکوتین کاهش معنی‌داری را در تعداد سلول‌های زایا (اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید) و همچنین تعداد سلول‌های سرتولی نشان داد که با مطالعات پیشین صورت گرفته در این زمینه همخوانی داشت (۳۰ و ۲۹). مطالعات انجام پذیرفته در این راستا همچنین نشان داده است که تجویز نیکوتین در موش با کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک و اختلال در روند تکثیر سلول‌های زایا همراه است که این امر یافته‌های حاصل از ارزیابی اسپرماتوژنز در این مطالعه را نیز تایید می‌کند (۷). هم راستا با یافته‌های پژوهش حاضر گزارشات پیشین نیز نشان داده‌اند که نیکوتین به واسطه کاهش جمیع سلول‌های زایای بیضه موجب کاهش قابل‌توجه قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخامت اپی‌تلیوم زایا و همچنین افزایش فضای حفره داخلی لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه می‌گردد (۳۱). کربوهیدرات‌ها به ویژه گلوکز منبع اصلی و ضروری انرژی در تقسیمات سلول‌های میتوزی می‌باشند و سد خونی - بیضه ای مسیر اصلی انتقال گلوکز به لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه می‌باشد (۳۲). سلول‌های زایای بیضه نیز از لاکتات به عنوان منبع انرژی و مسئول تحریک سنتز پروتئین و RNA بهره می‌برند (۳۳). در این مطالعه، اپی -

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

F. Azad (MSc)^{*1}, V. Nejati (PhD)¹, A. Shalizar Jalali (PhD)², Gh. Najafi (PhD)², F. Rahmani (PhD)¹

1. Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R.Iran

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

J Babol Univ Med Sci; 20(3). ; Mar 2018; PP: 50-8

Received: Oct 3rd 2017, Revised: Jan 24th 2018, Accepted: Feb 14th 2018.

ABSTRACT

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

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

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

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

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

Please cite this article as follows:

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

***Corresponding Author; F. Azad (MSc)**

Address: Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R.Iran.

Tel: +98 44 32755295

E-mail: farnam.azad@hotmail.com

References

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

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