

## تأثیر محافظتی ژل رویال همراه با ویتامین C در برابر اثرات تخریبی آنمی همولیتیک القا شده به وسیله فنیل هیدرازین بر پارامترهای بافت بیضه موش های سفید آزمایشگاهی بالغ

حجت عنبر<sup>۱</sup>، رسول شهروز<sup>۲\*</sup>، حسن ملکی نژاد<sup>۳</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** کاهش میزان گردش خون و اکسیژن رسانی می تواند موجب اختلال در عملکرد و ساختار بافتی بیضه و اسپرماتوژنز گردد. مطالعه حاضر جهت ارزیابی توان محافظتی ویتامین C همراه با ژل رویال در برابر تغییرات ساختار بافتی بیضه ناشی از کم خونی همولیتیک تجربی در موش های بالغ انجام شد.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، تعداد ۳۲ سر موش بالغ ۲۵-۲۰ گرمی به ۴ گروه تقسیم شدند که شامل گروه کنترل، دریافت کننده سرم فیزیولوژی (دوز ۱/۱ میلی لیتر به روش داخل صفاقی)؛ گروه کنترل شم، دریافت کننده فنیل هیدرازین (دوز ۶ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم به روش داخل صفاقی)؛ گروه فنیل هیدرازین همراه با ویتامین C (دوز ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به روش داخل صفاقی) و ژل رویال (دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از طریق دهانی) و گروه دریافت کننده ژل رویال همراه با ویتامین C بودند. متعاقب دوره درمانی ۳۵ روزه، نمونه های بافتی برداشته شدند. پس از پاساژ بافتی، قالب گیری و تهیه مقاطع پارافینی، اسلایدها به وسیله روش هماتوکسیلین - ائوزین رنگ آمیزی شدند. پارامترهای مختلف بافتی مانند ضخامت کپسول بیضه، ارتفاع اپی تلیوم زایگر، قطر لوله های منی ساز، تعداد لوله های منی ساز در یک میلی متر مربع، میانگین تعداد اسپرماتوسیت اولیه، سلول های لیدیگ، سلول های سرتولی فعال و ماست سل ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته ها:** مشاهدات، نشان دهنده کاهش قابل ملاحظه پارامترهای ارزیابی شده در گروه دریافت کننده PHZ بود که تجویز توأم ژل رویال و ویتامین C به عنوان آنتی اکسیدانت از این کاهش جلوگیری کرد.

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد تجویز توأم ویتامین C و ژل رویال، قادر به خنثی کردن عوارض مخرب ناشی از آنمی همولیتیک در دستگاه تناسلی موش های سفید آزمایشگاهی می باشد.

**کلید واژه ها:** آنمی همولیتیک؛ فنیل هیدرازین؛ اسید اسکوربیک؛ ژل رویال؛ بیضه؛ موش.

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد بافت شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

<sup>۲</sup> دانشیار بافت شناسی و جنین شناسی دامپزشکی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

<sup>۳</sup> استاد فارماکولوژی و سم شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

\* نویسنده مسئول مکاتبات:

**رسول شهروز**، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:  
rasoul\_shahrooz@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۲

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۹

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Anbara H, Shahrooz R, Malekinejad H. The protective effect of royal jelly and vitamin c coadministration on detrimental effects of Phenylhydrazine-induced hemolytic anemia on the parameters of testicular tissue in adult laboratory mice. Qom Univ Med Sci J 2015;9(8):1-10. [Full Text in Persian]

## مقدمه

آنمی همولیتیک می تواند عوامل مختلفی داشته باشد، از جمله این عوامل می توان به عوامل شیمیایی صنعتی مانند برخی سموم تجاری یا استفاده ناصحیح از برخی داروها و یا برخی عوامل طبیعی مانند سم حیوانات و برخی انگل ها اشاره کرد که عوامل ذکر شده هر کدام به نوبه خود می توانند منجر به ایجاد لیز در گلبول های قرمز و ایجاد آنمی همولیتیک شوند. یکی از عوارض ناشی از این نوع کم خونی که کمتر مورد توجه قرار گرفته است، افزایش میزان آهن بافتی در اثر لیز شدن گلبول های قرمز و کاهش اکسیژن (هیپوکسی) ناشی از این نوع کم خونی می باشد. میزان آهن داخل سلولی مانند تمامی مواد ضروری مورد نیاز سلول، به طور دقیق توسط مکانیسم های غشای سلول و خود سلول تنظیم می شود و ثابت شده است افزایش میزان این ماده در داخل و خارج از سلول باعث ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو و آسیب به چربی غشای سلول و اندامک های آن می شود (۶-۱). در خصوص اهمیت آنمی همولیتیک می توان بیان کرد حدود ۲۰ میلیون انسان در ارتفاعات بالای ۳۰۰۰ متر از سطح دریا و تحت شرایط کمبود اکسیژن زندگی می کنند. آمار نیز نشان داده است جمعیت افراد شاغل در ارتفاعات رو به افزایش است. در دهه گذشته مطالعاتی در رابطه با رشد، تکامل و تولید، تحت شرایط هیپوکسی انجام شده است (۷، ۸). همچنین گزارشها نشان می دهد هیپوکسی مزمن باعث توقف اسپرماتوزن در موش های صحرایی و میمون می شود (۹). هیپوکسی در جوندگان نر نیز از سنتز و آزاد شدن گنادوتروپین ها جلوگیری می کند (۱۰، ۱۱). فنیل هیدرازین برای نخستین بار توسط Emil Fischer در سال ۱۸۷۵ از هیدرازین تهیه شد. از فنیل هیدرازین برای آماده سازی ایندول ها (Indoles) که یک ماده حد واسط برای تولید رنگ های مختلف و مواد دارویی است استفاده می شود. همچنین برای تولید فنیل هیدرازون ها (Phenylhydrazones) از فنیل هیدرازین و ترکیب های طبیعی استفاده می شود که برای تشخیص و تفکیک دسته بندی قندهای ساده از یکدیگر به کار می رود (۱۲، ۱۳). طبق بررسی های بعمل آمده فنیل هیدرازین از طریق آسیب مستقیم به غشای گلبول های قرمز اثرات خود را بروز می دهد (۱۴).

از آنجایی که فنیل هیدرازین به عنوان ماده ای مناسب برای القای این نوع کم خونی و مطالعه مکانیسم های کم خونی توصیف شده است (۱۵)، لذا در این مطالعه از این ماده به عنوان عامل ایجاد کننده کم خونی استفاده شد. ویتامین C یا ال-آسکوربات، ریزمغذی حیاتی برای گونه های پیشرفته مانند انسان، میمون ها و شمار اندکی از گونه های دیگر پستانداران، به ویژه خوکچه هندی و تعدادی از گونه های پرندگان و برخی ماهی ها می باشد. مقدار ویتامین C به عنوان یک شاخص اساسی برای تعریف ارزش تجاری میوه ها و سبزی ها به کار می رود. ویتامین C ماده جامد سفید رنگ و یکی از ویتامین های محلول در آب و غیرسمی، و دارای استر حلقوی بوده و در محیط آبی هیدرولیز می شود و حالت اسیدی پیدا می کند (۱۶، ۱۷). این ویتامین در واکنش های شیمیایی بدن یک حمل کننده الکترون و از مهم ترین آنتی اکسیدان ها است (۱۸)، که در خنثی سازی رادیکال های آزاد و رفع استرس اکسیداتیو نقش دارد (۱۹). ژل رویال (Royal Jelly, RJ)، به عنوان غذای ملکه زنبورهای عسل شناخته شده و توسط لاروهای جوان زنبور عسل و ملکه مورد استفاده قرار می گیرد. این ماده نقش مهمی در تغذیه ملکه داشته و از غدد هیپوفارینکس و مندیبولار زنبورهای کارگر جوان ترشح می شود. 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 بزرگتر بودن جثه، قدرت باروری زیاد و طولانی شدن عمر ملکه است (۲۰، ۲۱). همچنین نشان داده شده است ژل رویال دارای انواع فعالیت های بیولوژیکی در سلول ها و بافت های مختلف مدل های حیوانی است (۲۲). ژل رویال اثرات تحریکی بر اندام های مختلف بدن داشته و می تواند عملکرد آنها را بهبود بخشد (۲۳). ژل رویال یک محرک هورمونی کمک کننده به حفظ فعالیت منظم و طبیعی متابولیکی هورمون است، همچنین یک تقویت کننده مکمل انرژی برای تمام سنین به شمار می رود و در درمان مشکلات از کارافتادگی جنسی مزمن ارزشمند است (۲۴). مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات محافظتی ژل رویال و ویتامین C در جلوگیری از اثرات سوء آنمی همولیتیک القا شده توسط فنیل هیدرازین بر کیفیت پارامترهای مورفومتری بیضه در موش های سوری بالغ انجام شد.

## روش بررسی

در این مطالعه، فنیل هیدرازین (Sigma Aldrich P6926)، به عنوان عامل ایجادکننده کم خونی همولیتیک مورد استفاده قرار گرفت (۲۶،۲۵،۱۴). ویتامین C (۵۰۰ میلی گرم بر ۵ میلی لیتر) از شرکت دارو پخش (تهران- ایران) تهیه شد. ژل رویال مورد استفاده در این مطالعه شهریور ماه سال ۱۳۹۲ از کندوهای ۱۹ و ۲۱ زنبورستان شهرستان ارومیه استحصال و با هم مخلوط شد، سپس تا زمان انجام آزمایش و پس از هر بار استفاده، به صورت فریز نگهداری شد. موش‌ها به طور تصادفی به ۴ گروه شامل ۸ سر موش بالغ با وزن ۲۵-۲۰ گرمی تقسیم شدند. قبل از شروع آزمایش حیوانات به مدت ۲ هفته جهت سازگاری با شرایط در محیط قرار گرفتند. همه موارد اخلاقی مربوط به کار با حیوانات آزمایشگاهی در حین انجام این مطالعه به دقت رعایت و موش‌ها در چرخه ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی آزاد به آب و غذای مناسب نگهداری شدند.

حیوانات در ۴ گروه به شرح زیر قرار گرفتند:

۱- گروه کنترل موش‌هایی بودند که سرم فیزیولوژی را به مقدار ۰/۱ میلی لیتر در روز به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند.

۲- گروه کنترل شم (PHZ) که به آنها فنیل هیدرازین (Phenylhydrazine, PHZ) با دوز ۸ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم از وزن بدن به صورت تزریق داخل صفاقی برای بار اول و متعاقباً در دفعات بعدی با دوز ۶ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم از وزن بدن به صورت تزریق داخل صفاقی در ۴۸ ساعت جهت ایجاد آنمی همولیتیک تزریق گردید (۲۵).

۳- گروه تجربی (PHZ+Vit C+RJ) شامل موش‌هایی بود که PHZ را با دوز مشابه گروه کنترل شم دریافت و به همراه آن ویتامین C را با دوز ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر وزن بدن به طور روزانه به صورت تزریق داخل صفاقی (۲۷)، به همراه ژل رویال با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر وزن بدن (۲۸) به طور روزانه با روش گاواژ، ۴ ساعت قبل از تزریق فنیل هیدرازین دریافت کردند.

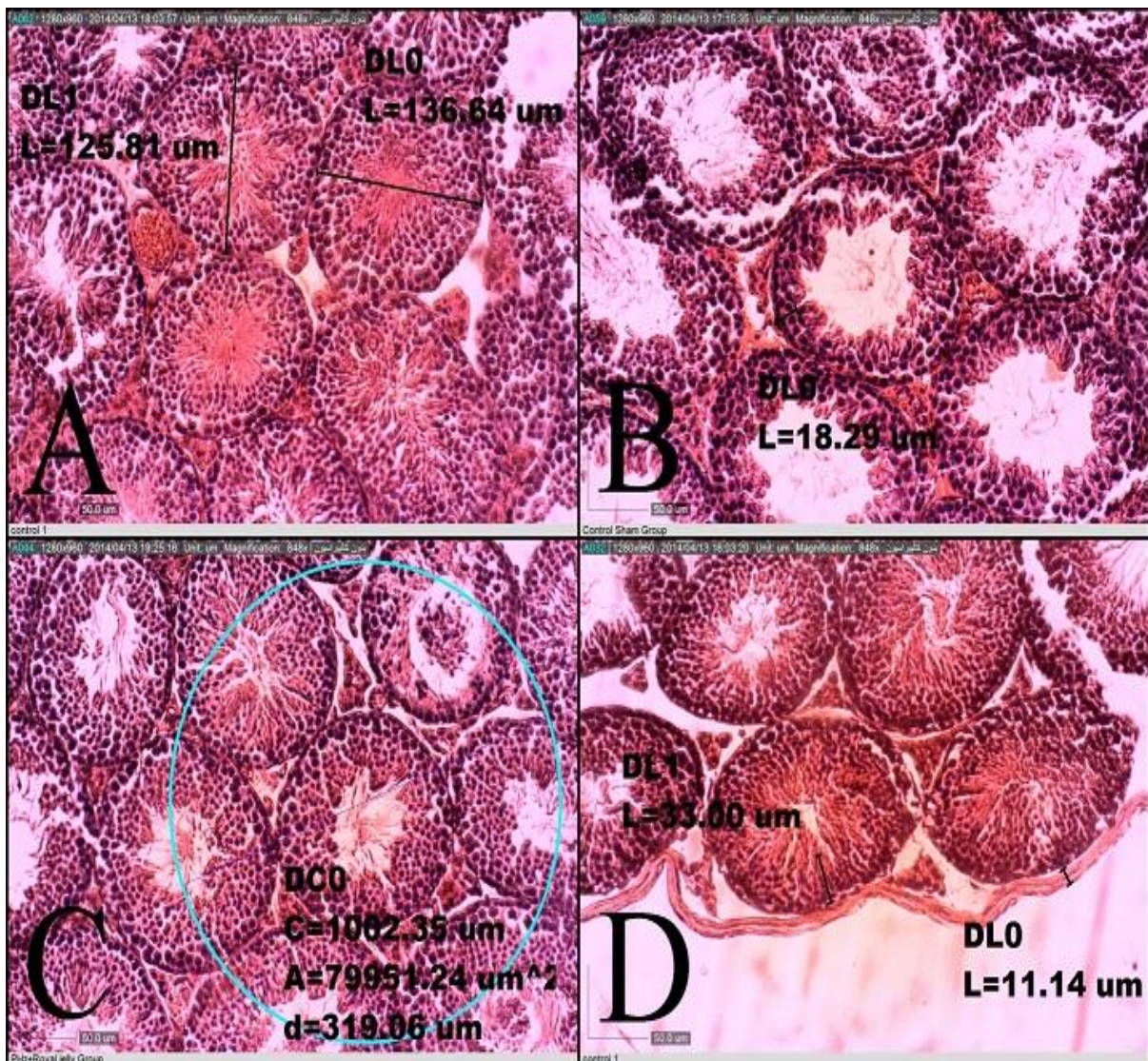
۴- گروه کنترل منفی (Vit C+RJ) موش‌هایی بودند که ژل رویال و ویتامین C را با هم و با دوزهای مشابه گروه قبلی بدون تزریق فنیل هیدرازین دریافت کردند.

دوره درمانی به مدت ۳۵ روز در نظر گرفته شد.

بعد از پایان دوره درمان، موش‌ها توسط کتامین (دوز ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت تزریق داخل صفاقی) بیهوش و سپس آسان‌کشی شدند. نمونه‌های بافتی جدا شده و پس از قرارگیری در مراحل تهیه مقاطع بافتی و تهیه لام، با هماتوکسیلین - اتوزین رنگ آمیزی و به وسیله عدسی مدرج مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین داده‌ها با استفاده از میکروسکوپ دیجیتال مخصوص Dino Capture 2.0 The versatile digital Microscope version 1.4.3 کنترل شدند. برای شمارش تعداد سلول‌های لیدیگ، سرتولی و سلول‌های ایمنی تک‌هسته‌ای از عدسی مشبک استفاده شد (۲۹). نتایج حاصل از این بررسی‌ها با نرم افزار SPSS PASW Statistics نسخه ۱۸ و آزمون واریانس یک طرفه آنالیز و گروه‌های مختلف توسط تست تعقیبی دانکن مورد مقایسه آماری قرار گرفتند. سطح معنی داری،  $p < 0/05$  در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

در گروه PHZ، اغلب لوله‌های منی ساز فاقد اسپرم بوده و ضخامت این لوله‌ها نسبت به گروه کنترل، کاهش ظاهری مشخصی را نشان داد. درحالی که در گروه PHZ+Vit C+RJ لوله‌های منی ساز تا حد زیادی بازسازی شده بودند. دریافت توأم ژل رویال و ویتامین C، فاقد اثرات مخرب در بافت بیضه و لوله‌های منی ساز بود (شکل A, B, C, D).



شکل: در تصاویر فوق، نحوه مورفومتری با Dino Capture در برخی از پارامترهای اندازه گیری شده نشان داده شده است. رنگ آمیزی H&E با درشتنمایی (100x).

A: گروه کنترل، اپی تلیوم زایگر در اغلب لوله های منی ساز ضخیم بوده و تعدادی از آنها مرحله اسپرمیوژنز را نشان می دهند.

B: گروه کنترل شم، اپی تلیوم زایگر در اغلب لوله های منی ساز دارای ضخامت کم بوده و مرحله اسپرمیوژنز را نشان نمی دهند. بافت بینابینی

در بعضی نواحی دارای ادم می باشد.

C: گروه تجربی، تجویز ترکیب ژل رویال و ویتامین C به همراه PHZ موجب بهبود قابل توجهی در ساختار ظاهری لوله های منی ساز شده است.

D: گروه کنترل منفی، ظاهر ساختار بافتی لوله های منی ساز را نشان می دهد که تجویز ترکیب ژل رویال و ویتامین C فاقد اثر منفی بر بافت بیضه می باشد.

ضخامت اپی تلیوم زایگر در گروه PHZ در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافت ( $p < 0/05$ )، در حالی که در گروه PHZ+Vit C+RJ ضخامت اپی تلیوم بیشتر شده و با گروه PHZ اختلاف معنی داری بود ( $p < 0/05$ ). همچنین استفاده از Vit C+RJ، ضخامت اپی تلیوم زایگر را به اندازه گروه کنترل و یا بیشتر از آن افزایش داد و با آن گروه، فاقد اختلاف معنی دار بود (جدول شماره ۱). میانگین قطر لوله های منی ساز در گروه PHZ به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داد ( $p < 0/05$ ).

اندازه ضخامت کپسول بیضه در گروه دریافت کننده PHZ در مقایسه با گروه کنترل، به طور معنی داری افزایش نشان داد ( $p < 0/05$ ). در گروه PHZ+Vit C+RJ، ضخامت کپسول بیضه به میزان قابل توجهی کاهش یافت و با هر دو گروه کنترل شم و کنترل، اختلاف معنی داری داشت ( $p < 0/05$ ). بنابراین، کاهش ضخامت کپسول به اندازه گروه کنترل نبود. در گروه کنترل منفی استفاده از Vit C+RJ موجب افزایش میانگین ضخامت کپسول بافت بیضه نشد و با گروه کنترل اختلاف معنی داری نداشت (جدول شماره ۱).

PHZ دارای اختلاف معنی داری بود و گروه دریافت کننده Vit C+RJ نیز با گروه کنترل شم، اختلاف معنی داری داشت ( $p < 0.05$ ) (جدول شماره ۱). میانگین تعداد لوله‌های منی‌ساز در سطح یک میلی‌متر مربع در گروه PHZ (گروه کنترل شم)، همچنین گروه PHZ+Vit C+RJ در مقایسه با گروه کنترل، به‌طور معنی داری کاهش نشان داد ( $p < 0.05$ ). هر دو گروه دریافت کننده Vit C+RJ و PHZ+Vit C+RJ با گروه کنترل شم نیز اختلاف معنی داری را نشان دادند ( $p < 0.05$ ) (جدول).

در حالی که در گروه PHZ+Vit C+RJ میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز در مقایسه با گروه کنترل و گروه کنترل شم دارای اختلاف معنی داری بود ( $p < 0.05$ ). در گروه دریافت کننده Vit C+RJ قطر لوله‌های منی‌ساز تقریباً برابر گروه کنترل بود و با این گروه اختلاف معنی داری نداشت (جدول شماره ۱). ضخامت بافت بینابینی در گروه PHZ (گروه کنترل شم)، نسبت به گروه کنترل، به‌طور معنی داری افزایش نشان داد ( $p < 0.05$ ). ضخامت بافت بینابینی در گروه PHZ+Vit C+RJ با هر دو گروه کنترل و

جدول: نتایج بررسی‌های مورفومتری مقاطع بافتی بیضه

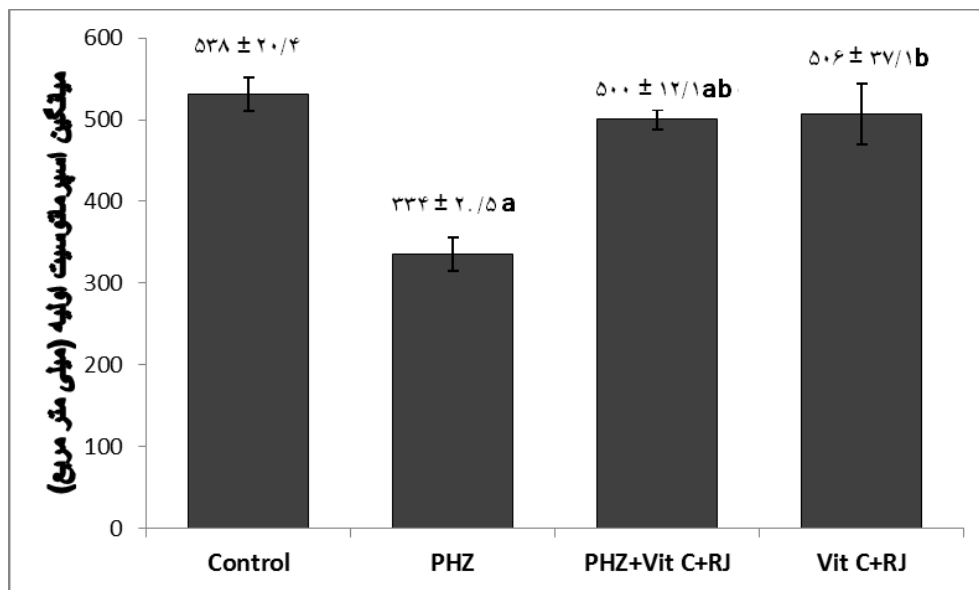
گروه	ضخامت کپسول بیضه (میکرومتر)	ضخامت اپی‌تلیوم زایگر (میکرومتر)	قطر لوله‌های منی‌ساز (میکرومتر)	ضخامت بافت بینابینی (میکرومتر)	تعداد لوله‌های منی‌ساز در (یک میلی‌متر مربع)
کنترل	104 ± 0.2	37.4 ± 0.6	144.5 ± 1.2	23.7 ± 0.5	54.4 ± 0.8
PHZ	21.7 ± 1.0 <sup>a</sup>	25.3 ± 0.7 <sup>a</sup>	114.9 ± 1.6 <sup>a</sup>	44.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	40.8 ± 1.5 <sup>a</sup>
PHZ + Vit C + RJ	11.7 ± 0.4 <sup>ab</sup>	34.1 ± 0.7 <sup>ab</sup>	130.8 ± 1.0 <sup>ab</sup>	34.7 ± 0.5 <sup>ab</sup>	49.8 ± 0.6 <sup>ab</sup>
Vit C + RJ	10.1 ± 0.3 <sup>b</sup>	38.5 ± 0.8 <sup>b</sup>	145.4 ± 1.2 <sup>b</sup>	24.6 ± 0.6 <sup>b</sup>	54.2 ± 0.8 <sup>b</sup>

(حرف a نشان‌دهنده دارابودن اختلاف معنی دار با گروه کنترل و حرف b نشان‌دهنده دارابودن اختلاف معنی دار با گروه کنترل شم می‌باشد ( $p < 0.05$ )).

PHZ: فنیل هیدرازین، RJ: ژل رویال، Vit C: ویتامین C

اختلاف معنی داری با گروه‌های کنترل و کنترل شم نشان داد ( $p < 0.05$ ). گروه دریافت کننده Vit C+RJ دارای اختلاف معنی داری با گروه کنترل شم بود ( $p < 0.05$ ) (نمودار شماره ۱).

میانگین تعداد اسپرماتوسیت اولیه در گروه PHZ نسبت به گروه کنترل دارای کاهش معنی داری بود ( $p < 0.05$ ). همچنین میانگین اسپرماتوسیت اولیه در گروه PHZ+Vit C+RJ،

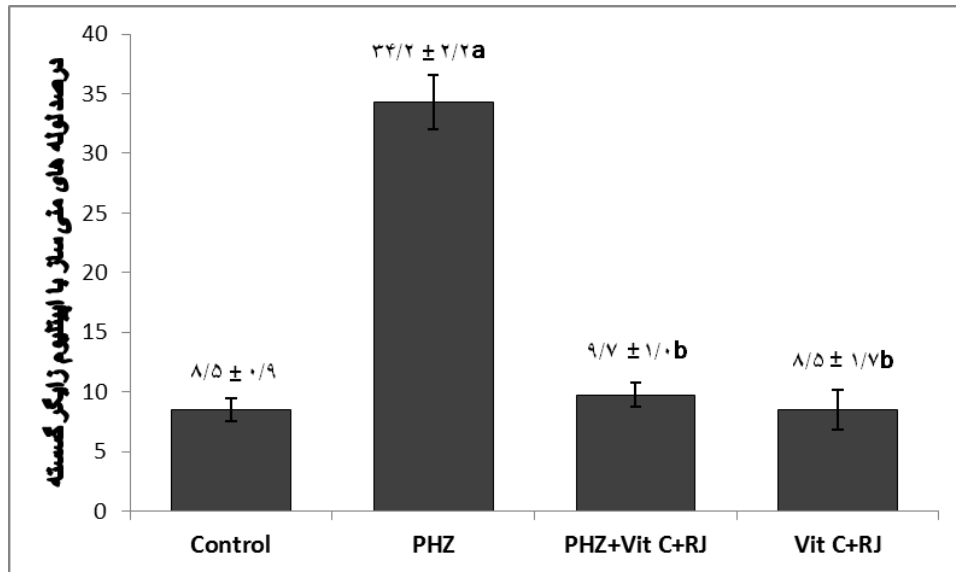


نمودار شماره ۱: نتایج مربوط به میانگین اسپرماتوسیت اولیه (حرف a، نشان‌دهنده دارابودن اختلاف معنی دار با گروه کنترل و حرف b، نشان‌دهنده دارابودن اختلاف معنی دار با گروه کنترل شم می‌باشد ( $p < 0.05$ )).

PHZ: فنیل هیدرازین، RJ: ژل رویال، Vit C: ویتامین C

گروه، اختلاف معنی داری نداشت، ولی با گروه PHZ، اختلاف معنی دار بود ( $p < 0.05$ ). در گروه Vit C+RJ، میانگین لوله‌های منی‌ساز با اپی‌تلیوم زایگر گسیخته، مشابه گروه کنترل بود و با این گروه اختلاف معنی داری نداشت (نمودار شماره ۲).

درصد لوله‌های با اپی‌تلیوم گسیخته در گروه PHZ به میزان زیاد نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی داری را نشان داد ( $p < 0.05$ ). در گروه PHZ+Vit C+RJ میانگین درصد لوله‌های با اپی‌تلیوم زایگر گسیخته به اندازه گروه کنترل کاهش نشان داد و با این

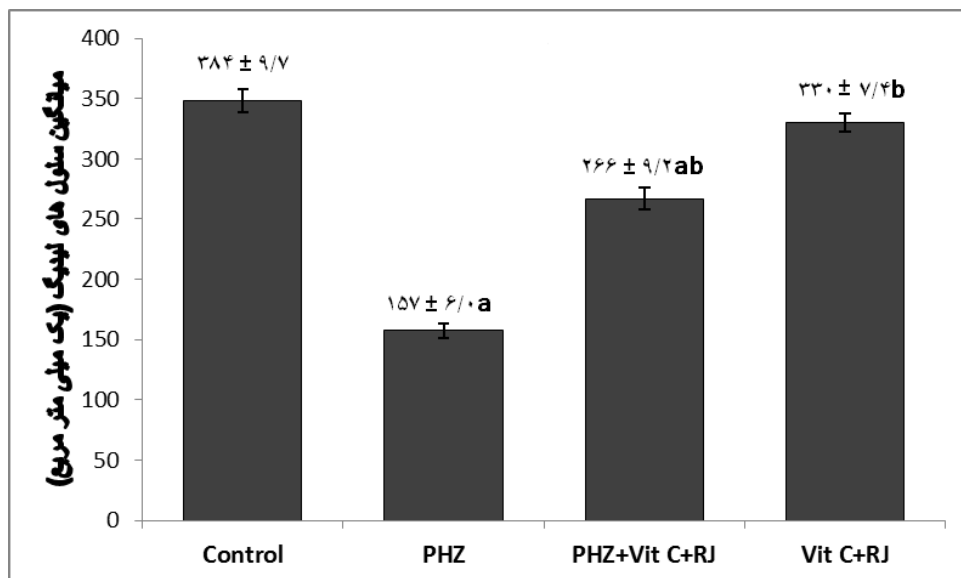


نمودار شماره ۲: نتایج مربوط به بررسی درصد لوله‌های منی‌ساز با اپی‌تلیوم زایگر گسیخته (حرف a، نشان‌دهنده دارابودن اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و حرف b، نشان‌دهنده دارابودن اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل شم می‌باشد) ( $p < 0.05$ ).

PHZ: فنیل هیدرازین، RJ: ژل رویال، Vit C: ویتامین C

با گروه PHZ نیز دارای اختلاف بود، ولی گروه Vit C+RJ فاقد اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل بود، درحالی‌که این گروه با گروه PHZ، اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0.05$ ) (نمودار شماره ۳).

میانگین پراکندگی سلول‌های لیدیک در سطح یک میلی‌متر مربع از بافت بیضه به تنهایی و به همراه آنتی‌اکسیدانت‌ها در هر دو گروه دریافت‌کننده فنیل هیدرازین با گروه کنترل از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری بود ( $p < 0.05$ ). گروه PHZ+Vit C+RJ

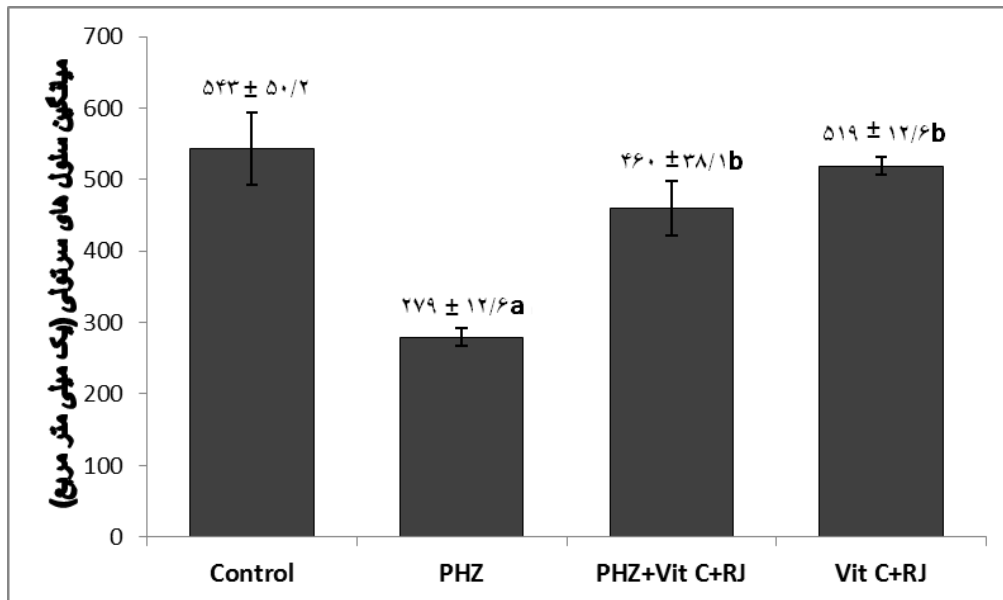


نمودار شماره ۳: نتایج مربوط به میانگین سلول‌های لیدیک (حرف a، نشان‌دهنده دارابودن اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل؛ حرف b، نشان‌دهنده دارابودن اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل شم می‌باشد) ( $p < 0.05$ ).

PHZ: فنیل هیدرازین، RJ: ژل رویال، Vit C: ویتامین C

میانگین تعداد سلول‌های سرتولی فعال (سلول‌های سرتولی که در قسمت رأسی آنها اسپرمتوسیت‌های درحال تکامل به صورت مجتمع قرار داشتند) در گروه PHZ نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی‌داری داشت، درحالی‌که در گروه‌های دریافت‌کننده Vit C+RJ و PHZ+Vit C+RJ، میانگین تعداد سلول‌های سرتولی فعال (یک میلی‌متر مربع) بود (نمودار شماره ۴). ( $p < 0.05$ )

میانگین تعداد سلول‌های سرتولی فعال (سلول‌های سرتولی که در قسمت رأسی آنها اسپرمتوسیت‌های درحال تکامل به صورت مجتمع قرار داشتند) در گروه PHZ نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی‌داری داشت، درحالی‌که در گروه‌های دریافت‌کننده

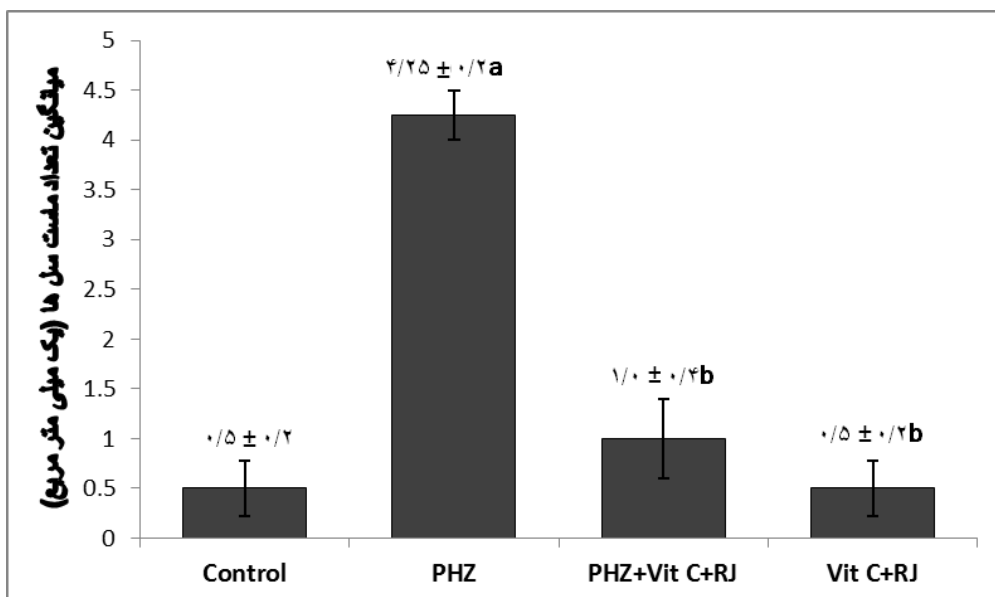


نمودار شماره ۴: نتایج مربوط به میانگین سلول‌های سرتولی (حرف a، نشان‌دهنده دارابودن اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و حرف b، نشان‌دهنده دارابودن اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل شم می‌باشد) ( $p < 0.05$ ).

PHZ: فنیل هیدرازین، RJ: ژل رویال، Vit C: ویتامین C

درحالی‌که در سایر گروه‌ها، میانگین تعداد این سلول‌ها به اندازه گروه کنترل کاهش نشان داد و بین این گروه‌ها با گروه کنترل، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (نمودار شماره ۵).

میانگین تعداد ماست‌سل‌ها در کپسول بیضه در گروه دریافت‌کننده PHZ به میزان بسیار زیادی افزایش نشان داد و نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری بود ( $p < 0.05$ ).



نمودار شماره ۵: نتایج مربوط به میانگین تعداد ماست‌سل‌ها (حرف a، نشان‌دهنده دارابودن اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و حرف b، نشان‌دهنده دارابودن اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل شم می‌باشد) ( $p < 0.05$ ).

PHZ: فنیل هیدرازین، RJ: ژل رویال، Vit C: ویتامین C

## بحث

مطالعات نشان می‌دهد آنمی همولیتیک از دو راه ممکن است اثر خود را اعمال کند: اول آنمی و در پی آن کمبود اکسیژن؛ دوم استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش آهن خون.

آنمی همولیتیک و لیز شدن گلبول‌های قرمز خون موجب کاهش ظرفیت انتقال اکسیژن و افزایش میزان آهن خون شده که این به نوبه خود پایه گذار یک سری از تغییرات در بدن می‌باشد (۶-۲).

همچنین نشان داده شده است افزایش آهن بافتی از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو باعث آسیب شدید به غشا، پروتئین‌ها و DNA می‌شود. در مطالعه حاضر مشاهده گردید آنمی همولیتیک ناشی

از تجویز فنیل هیدرازین موجب کاهش میانگین اکثر پارامترهای بافتی بیضه شده است. در مطالعه حاضر فنیل هیدرازین موجب افزایش ضخامت کپسول بافت بیضه گردید که این نشان‌دهنده

فیروزه شدن بافت بیضه می‌باشد و این روند با افزایش میانگین تعداد ماست سل‌ها در گروه PHZ همخوانی دارد. در یک مطالعه

دیگر نشان داده شد ماست سل‌ها موجب فیروزه شدن بافت در بعضی از بیماری‌ها مانند آرتریت روماتوئید (۳۰) و بیماری ریه فیبروتیک می‌شوند (۳۱،۳۲). ماست سل‌ها با ترشح فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی (Basic Fibroblast Growth Factor, BFGF)

موجب تکثیر فیبروبلاست‌ها و حالت فیروزی بافت می‌شوند (۳۳،۳۴). تجویز ژل رویال و ویتامین C به همراه فنیل هیدرازین موجب کاهش تعداد ماست سل‌ها و به موازات آن، کاهش

ضخامت کپسول بیضه می‌شود. علاوه بر این، هیپوکسی حاصل از آنمی همولیتیک موجب واکنش‌های التهابی و عروقی در بافت بینابینی بیضه و افزایش حجم این بخش از بیضه می‌گردد (۳۵). در

مطالعه حاضر نیز ضخامت بافت بینابینی بیضه در گروه PHZ افزایش نشان داد و تجویز آنتی‌اکسیدانت‌ها در گروه PHZ+Vit C+RJ تا حدودی موجب کاهش آن گردید ( $p < 0.05$ ).

این نتیجه را می‌توان با افزایش تعداد ماست سل‌ها در بافت بیضه گروه PHZ مرتبط دانست؛ چراکه ماست سل‌ها علاوه بر ایجاد حالت فیروزی در بافت، با ترشح واسطه‌های التهابی مانند

اینترلوکین‌ها، هیستامین و هپارین موجب واکنش‌های پیش‌التهابی، التهابی و ادم می‌شوند (۳۶). همچنین در اثر کاهش فعالیت متابولیکی سلول‌های زایگر و کاهش تکثیر سلولی به دلیل کمبود

اکسیژن، ضخامت طبقه بافت پوششی و قطر لوله‌های منی‌ساز کاهش یافته و فضای بینابینی به دلیل ادم بافتی افزایش می‌یابد (۷). سلول‌های لیدینگ با ترشح فاکتورهای رشد یا عوامل مهارکننده، نقش مهمی در تنظیم جمعیت ماست سل‌ها در بافت بیضه دارند (۳۷). نتایج چندین مطالعه نشان می‌دهد افزایش در تعداد ماست سل‌های بیضه با اختلالات اسپرماتوژنز همراه بوده است. این اختلالات در نتیجه تراکم رادیکال‌های آزادی است که توسط ماست سل‌های دگرانوله بعد از تحریک ایمونولوژیک یا آلرژیک تولید شده‌اند (۳۸،۳۹).

طبق مطالعات انجام‌شده، استرس اکسیداتیو ناشی از کم‌خونی تجربی در پی تجویز فنیل هیدرازین در گروه PHZ موجب کاهش تکثیر و تمایز سلول‌های زایگر لوله‌های منی‌ساز شده و ضخامت

اپی‌تلیوم زایگر، قطر و تعداد لوله‌های منی‌ساز نیز در این گروه، به‌طور معنی‌داری کاهش نشان می‌دهد که این روند به علت اثرات آنتی‌اکسیدانتی ژل رویال و ویتامین C در گروه PHZ+Vit C+RJ

به میزان قابل توجهی بهبود می‌یابد ( $p < 0.05$ ) (۴۰،۴۱). همچنین استرس اکسیداتیو ناشی از کم‌خونی همولیتیک موجب اختلال و کاهش عملکرد بیضه می‌شود (۴۲). نتایج تحقیقات نشان داده

است حساس‌ترین بخش در دستگاه تناسلی جنس نر، اپی‌تلیوم زایگر لوله‌های منی‌ساز است. این موضوع شاید بدین دلیل باشد که تحت شرایط هیپوکسی، سلول‌هایی که در فاصله بیشتری

نسبت به مویرگ‌ها و غشای پایه قرار دارند اکسیژن کمتری دریافت کرده و به کمبود اکسیژن بیشتر حساس هستند (۷). کاهش میانگین تعداد اسپرماتوسیت‌های اولیه در گروه PHZ،

نشان‌دهنده کاهش تقسیمات میتوزی در مرحله اسپرماتوسیتوژنز در اپی‌تلیوم زایگر بوده (۴۳)، که می‌تواند در نتیجه استرس اکسیداتیو ناشی از کم‌خونی همولیتیک تجربی رخ دهد (۴۴)، و

در گروه PHZ+Vit C+RJ به میزان قابل توجهی، بهبودی نشان دهد ( $p < 0.05$ ).

اختلال در عملکرد بیضه با کاهش تعداد سلول‌های لیدینگ ارتباط دارد (۴۵). در مطالعه حاضر، میانگین تعداد این سلول‌ها در یک میلی‌متر مربع از سطح مقطع بافتی بیضه در گروه PHZ، به‌طور

معنی‌داری کاهش نشان داد که در گروه دریافت‌کننده آنتی‌اکسیدانت‌ها به همراه فنیل هیدرازین، افزایش چشمگیری



وابسته به اثرات مستقیم کمبود اکسیژن بر اسپرماتوژنز و یا اثرات غیرمستقیم از طریق تأثیر آن بر محور هیپوفیزی - بیضه‌ای باشد (۴۸). همچنین قرار گرفتن در شرایط هیپوکسی نیز باعث کاهش وزن اندام و تغییر پارامترهای مورفومتریکی می‌گردد (۳۷).

### نتیجه‌گیری

با جمع‌بندی یافته‌های مطالعه حاضر چنین برمی‌آید که کم‌خونی همولیتیک ناشی از فنیل هیدرازین از طریق برهم زدن تعادل اکسیداسیون - احیا و پی‌ریزی واکنش‌های آماسی و تنش‌های اکسیداتیو موجبات آسیب بافتی بیضه را فراهم می‌آورد. درحالی‌که تجویز آنتی‌اکسیدانت‌های خوراکی مانند ژل رویال و ویتامین C در این شرایط از اثرات مخرب هیپوکسی و در پی آن استرس اکسیداتیو جلوگیری می‌کند. همچنین این نتایج نشان می‌دهد آنتی‌اکسیدانت‌های مذکور در گروه حیوانات سالم فاقد اثرات توکسیک می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه دوره کارشناسی ارشد بافت‌شناسی دانشگاه ارومیه می‌باشد. نویسندگان از بخش بافت‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه کمال تشکر و قدردانی را دارند.

داشت (p<۰/۰۵). در همین راستا، عملکرد سلول‌های سرتولی نیز دارای ارتباط مستقیم با سلول‌های لیدینگ و اسپرماتوژنز بوده و اختلال در عملکرد آنها موجب کاهش ترشح تستوسترون و اسپرماتوژنز می‌شود (۴۶). در مطالعه حاضر تعداد سلول‌های سرتولی فعال در گروه PHZ+Vit C+RJ نسبت به گروه PHZ، افزایش معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۵). گفته شده است کاهش تعداد سلول‌های اپی‌تلیوم زایگر و تعداد سلول‌های سرتولی و لیدینگ در بافت بیضه می‌تواند در اثر تجمع اسید لاکتیک به علت اختلال تنفس سلولی و میزان اکسیژن کم، رخ دهد. استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش آهن نیز از طریق آسیب به غشای فسفولیپیدی اندامک‌ها، اثرات سوء خود را نشان می‌دهد (۱). در هر حال اختلال در روند عملکرد بیضه و اسپرماتوژنز موجب گسیختگی در سری سلول‌های زایگر در لوله‌های منی‌ساز می‌شود (۴۷). در مطالعه حاضر تجویز آنتی‌اکسیدانت‌ها به همراه فنیل هیدرازین، درصد لوله‌های منی‌ساز با اپی‌تلیوم گسیخته‌شده را در مقایسه با گروه PHZ، به‌طور معنی‌داری کاهش داد (p<۰/۰۵). در این مطالعه تجویز ژل رویال و ویتامین C به‌تنهایی در هیچ‌کدام از پارامترهای بیضه‌ای اثر تخریبی نداشت و با دوزهای به‌کار رفته فاقد اثر توکسیک در بافت بیضه بود. نتایج گزارشها نشان می‌دهد قرارگیری در معرض هیپوکسی باعث کاهش چشمگیر در عملکرد بیضه شده که این تأثیرات می‌تواند

### References:

1. Puntarulo S. Iron, oxidative stress and human health. *Mol Aspects Med* 2005;26(4-5):299-312.
2. Lipschitz DA, Cook JD, Finch CA. A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. *N Engl J Med* 1974;290(22):1213-6.
3. Barton JC, Conrad ME, Nuby S, Harrison L. Effects of iron on the absorption and retention of lead. *J Lab Clin Med* 1978;92(4):536-47.
4. Stevens RG, Jones DY, Micozzi MS, Taylor PR. Body iron stores and the risk of cancer. *N Engl J Med* 1988;319(16):1047-52.
5. Ferrali M, Ciccoli L, Signorini C, Comporti M. Iron release and erythrocyte damage in allyl alcohol intoxication in mice. *Biochem Pharmacol* 1990;40(7):1485-90.
6. Friedmann B, Jost J, Rating T, Weller E, Werle E, Eckardt KU, et al. Effects of iron supplementation on total body hemoglobin during endurance training at moderate altitude. *Int J Sports Med* 1999;20(2):78-85.
7. Bustos-Obregón E, Esveile C, Contreras J, Maurer I, Sarabia L. Effects of chronic simulated hypobaric hypoxia on mouse spermatogenesis. *Int J Morphol Temuco* 2006;24(3):481-8.

8. Wu RSS. Effects of hypoxia on fish reproduction and development. New Yourk: Academic Press; 2009. p. 79-141. (Vol 27)
9. Macome JC, Costa LE, Martin IH, Taquini AC. Steroid biosynthesis by gonads of rats submitted to chronic hypobaric hypoxia. *Acta Physiol Lat Am* 1977;27(5):249-57.
10. Khmel'nitskii OK, Tararak T. Morphological characteristics of the pituitary-gonad system in high altitude hypoxia. *Biull Eksp Biol Med* 1991;111(4):432-6.
11. Rattner BA, Macmillan BT, Michael SD, Altland PD. Plasma gonadotrophins, prolactin and corticosterone concentrations in male mice exposed to high altitude. *J Reprod Fertil* 1980;60(2):431-6.
12. Fischer E, Baeyer A, Baeyer A. Ueber aromatische Hydrazinverbindungen. *CBER Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 1875;8(2):1641-3.
13. Streitwieser A, Heathcock CH. Introduction to organic chemistry. New York: Macmillan; 1976.
14. Grigorovich NA. On the pathogenesis of hemolytic anemia caused by phenylhydrazine (experimental data). *Biull Eksp Biol Med* 1966;61(2):29-32.
15. Berger J. Phenylhydrazine haematotoxicity. *J Appl Biomed* 2007;5:125-30.
16. McCluskey ES. Which vertebrates make vitamin C? *Origins* 1985;12(2):96-100.
17. du Toit R, Volsteedt Y, Apostolides Z. Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicology* 2001;166(1-2):63-9.
18. Siddique YH, Beg T, Afzal M. Antigenotoxic effects of ascorbic acid against megestrol acetate-induced genotoxicity in mice. *Hum Exp Toxicol* 2005;24(3):121-7.
19. Aly N, El-Gendy K, Mahmoud F, El-Sebae AK. Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice. *Pestic Biochem Physiol* 2010;97(1):7-12.
20. Ramadan MF, Al-Ghamdi A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *J Funct Food* 2012;4(1):39-52.
21. 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;9:4.
22. Zamani Z, Reisi P, Alaei H, Pilehvarian A. Effect of royal jelly on improving passive avoidance learning and spatial learning and memory in rats. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2012;20(2):211-19. [Full Text in Persian]
23. Shirzad H, Sedaghat A, Ghasemi S, Shirzad M. Effect of royal jelly on sterile wound healing in Balb/C mice. *J Armaghane Danesh* 2010;15(1):38-46. [Full Text in Persian]
24. 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.
25. Gorustovich AA, Steimetz T, Giglio MJ, Guglielmotti MB. A histomorphometric study of alveolar bone modeling and remodeling under experimental anaemia and polycythaemia in rats. *Arch Oral Biol* 2006;51(3):246-51.
26. Vannucchi AM, Paoletti F, Linari S, Cellai C, Caporale R, Ferrini PR, et al. Identification and characterization of a bipotent (erythroid and megakaryocytic) cell precursor from the spleen of phenylhydrazine-treated mice. *Blood* 2000;8:2559-68.
27. Yu F, Wang Z, Ju B, Wang Y, Wang J, Bai D. Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E. *Exp Toxicol Pathol* 2008;59(6):415-23.

28. Silici S, Ekmekcioglu O, Eraslan G, Demirtas A. Antioxidative effect of royal jelly in cisplatin-induced testes damage. *Urology* 2009;74(3):545-51.
29. Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987;147(Pt 3):229-63.
30. McCrea PC. Tissue mast cells in the bone marrow in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1961;20(1):83-5.
31. Zhang Q, Oh CK, Messadi DV, Duong HS, Kelly AP, Soo C, et al. Hypoxia-induced HIF-1 alpha accumulation is augmented in a co-culture of keloid fibroblasts and human mast cells: Involvement of ERK1/2 and PI-3K/Akt. *Exp Cell Res* 2006;312(2):145-55.
32. Erjefalt JS. Mast cells in human airways: The culprit? *Eur Respir Rev* 2014;23(133):299-307.
33. Keith I, Day R, Lemaire S, Lemaire I. Asbestos-induced fibrosis in rats: increase in lung mast cells and autacoid contents. *Exp Lung Res* 1987;13(3):311-27.
34. Dyduch G, Kaczmarczyk K, Okon K. Mast cells and cancer: Enemies or allies? *Pol J Pathol* 2012;63(1):1-7.
35. De-Matos IM, Talvani A, Rocha OO, Freire-Maia L, Teixeira MM. Evidence for a role of mast cells in the lung edema induced by Tityus serrulatus venom in rats. *Toxicon* 2001;39(6):863-7.
36. Rowley DA, Benditt EP. 5-Hydroxytryptamine and histamine as mediators of the vascular injury produced by agents which damage mast cells in rats. *J Exp Med* 1956;103(4):399-412.
37. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1996.
38. Hashimoto J, Nagai T, Takaba H, Yamamoto M, Miyake K. Increased mast cells in the limiting membrane of seminiferous tubules in testes of patients with idiopathic infertility. *Urol Int* 1988;43(3):129-32.
39. Nagai T, Takaba H, Miyake K, Hirabayashi Y, Yamada K. Testicular mast cell heterogeneity in idiopathic male infertility. *Fertil Steril* 1992;57(6):1331-6.
40. Jelodar G, Nazifi S, Akbari A. The prophylactic effect of vitamin C on induced oxidative stress in rat testis following exposure to 900 MHz radio frequency wave generated by a BTS antenna model. *Electromagn Biol Med* 2013;32(3):409-16.
41. Shalizar Jalali A, Najafi G, Hosseinchi M, Sedighnia A. Royal Jelly alleviates sperm toxicity and improves in vitro fertilization outcome in Stanazolol-treated mice. *Iran J Reprod Med* 2015;13(1):15-22.
42. Martins PR, Kerbauy J, Moraes-Souza H, Pereira Gde A, Figueiredo MS, Verreschi IT. Impaired pubertal development and testicular hormone function in males with sickle cell anemia. *Blood Cells Mol Dis* 2015;54(1):29-32.
43. Eurell JAC, Frappier BL, Dellmann H-D. *Dellmann's textbook of veterinary histology*. Ames, Iowa: Blackwell Pub; 2006.
44. Whitney MA, Royle G, Low MJ, Kelly MA, Axthelm MK, Reifsteck C, et al. Germ cell defects and hematopoietic hypersensitivity to gamma-interferon in mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia C gene. *Blood* 1996;88(1):49-58.
45. Wakui S, Motohashi M, Satoh T, Shirai M, Mutou T, Takahashi H, et al. Nuclear morphometric analysis of leydig cells of male pubertal rats exposed in utero to Di(n-butyl) phthalate. *J Toxicol Pathol* 2013;26(4):439-46.
46. Rezvanfar M, Sadrkhanlou R, Ahmadi A, Shojaei-Sadee H, Rezvanfar M, Mohammadirad A, et al. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. *Hum Exp Toxicol* 2008;27(12):901-10.
47. Trindade AA, Simoes AC, Silva RJ, Macedo CS, Spadella CT. Long term evaluation of morphometric and ultrastructural changes of testes of alloxan-induced diabetic rats. *Acta Cir Bras* 2013;28(4):256-65.
48. Farias JG, Bustos-Obregon E, Orellana R, Bucarey JL, Quiroz E, Reyes JG. Effects of chronic hypobaric hypoxia on testis histology and round spermatid oxidative metabolism. *Andrologia* 2005;37(1):47-52.

## ***The Protective Effect of Royal Jelly and Vitamin C Coadministration on Detrimental Effects of Phenylhydrazine-induced Hemolytic Anemia on the Parameters of Testicular Tissue in Adult Laboratory Mice***

Hojat Anbara<sup>1</sup>, Rasoul Shahrooz<sup>2\*</sup>, Hassan Malekinejad<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Master of Sciences in Histology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

<sup>2</sup>Associate Professor of Veterinary Histology & Embryology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

<sup>3</sup>Professor of Pharmacology & Toxicology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

**\*Corresponding Author:**

**Rasoul Shahrooz,**  
Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Email:  
rasoul\_shahrooz@yahoo.com

Received: 12 Jan, 2015

Accepted: 28 Feb, 2015

### **Abstract**

**Background and Objectives:** Reduction in blood circulation and oxygen delivery can affect structure and function of testicular tissue and spermatogenesis. The present study was conducted to evaluate the protective effect of vitamin C and royal jelly coadministration on the experimental hemolytic anemia-induced changes in testicular histoarchitecture in adult mice.

**Methods:** In this experimental study, 32 adult mice weighing 20-25g were divided into 4 groups, including control group that received normal saline (0.1mL, IP), sham-control group received phenylhydrazine (PHZ) (6mg/100, IP), PHZ+vitamin C (250mg/kg, IP)+royal jelly (100mg/kg, orally) group, and royal jelly+vitamin C group. Following the 35-day treatment period, the tissue samples were dissected out. After tissue passage, embedding, and section preparation, the slides underwent hematoxylin and eosin staining. Different parameters, such as testis capsular thickness, germinal epithelium height, seminiferous tubules diameter, number of seminiferous tubules per 1 mm<sup>2</sup>, mean number of primary spermatocytes, Leydig cells, active Sertoli cells, and mast cells, were assessed.

**Results:** Observations revealed a significant reduction in the evaluated parameters in the PHZ group, which this reduction was prevented by coadministration of royal jelly and vitamin C as an antioxidant.

**Conclusion:** The results of this study indicated that coadministration of vitamin C and royal jelly was able to neutralize the detrimental effect of hemolytic anemia on the reproductive system of laboratory mice.

**Keywords:** Anemia, Hemolytic; Phenylhydrazine; Ascorbic acid; Royal jelly; Testis; Mice.