مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۸، شماره ۲، تابستان ۹۷، صفحات ۸۱ تا ۹۱

Original Article

اثرات محافظتی ویتامین E بر کیفیت اسپرم و برخی از پارامترهای سرمی موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی در سمیت حاصل از دیانابول

محمد بابائی[۱]، زهرا طوطیان[۲]، حسن مروتی[۳]، بهادر شجاعی[۴]، سیمین فاضلی پور[۵]

[۱]دانشجوی دکترای تخصصی آناتومی و جنین شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۲]استاد، بخش آناتومی و جنین شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۳]استاد، بخش بافت شناسی و جنین شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۴]استاد، بخش آناتومی و جنین شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
[۵]استاد، گروه علوم تشریحی ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران ، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *استفاده از استروئیدهای آنابولیک-آندروژنیک در بین ورزشکاران بسیار گسترده است و داروهای آنابولیک، به ویژه دیانابول، به عنوان داروی نیروزا برای رشد و تقویت عضلات در جوانان استفاده می‌شوند؛ ولی با این حال درباره عوارض این دارو روی دستگاه تولیدمثل اطلاعات زیادی در دسترس نیست. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات محافظتی ویتامین E در برابر آسیب‌های ناشی از دیانابول بر دستگاه تناسلی نر انجام پذیرفت.*

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، *۷۲ سر موش نر بالغ نژاد NMRI به صورت تصادفی به یک گروه کنترل و هفت گروه تجربی تقسیم شدند. گروه‌های تجربی اول، پنجم، ششم و هفتم ویتامین E را به میزان IU/kgBW ۱۰۰ دریافت کردند. گروه‌های تجربی پنجم، ششم و هفتم چهار ساعت بعد از دریافت ویتامین E به ترتیب داروی دیانابول به میزان ۵، ۱۰ و ۲۰ mg/kgBW و گروه های دوم، سوم و چهارم تجربی به ترتیب تنها دیانابول به میزان ۵، ۱۰ و ۲۰ mg/kgBW دریافت کردند، روش تجویز در تمامی گروه‌ها به صورت خوراکی و به مدت ۴۲ روز بود. ۲۴ ساعت پس از آخرین تیمار، نمونه‌های خونی و پارامترهای اسپرم ارزیابی شدند.*

یافته‌ها: *کاهش معنی‌دار ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام (TAC) و افزایش سطح مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در سرم مشاهده شد که تجویز ویتامین E موجب بهبود آنها شد. همچنین تجویز ویتامین E باعث بهبود در پارامترهای اسپرم و سطح تستوسترون خون شد.*

نتیجه‌گیری: *اینگونه تداعی می‌شود که ویتامین **E** به عنوان یک مهارکننده رادیکال آزاد باعث کاهش آسیب‌های اکسیداتیو دیانابول است.*

واژگان کلیدی: *ویتامین E، دیانابول، اسپرم، تستوسترون، موش.*

مقدمه

استفاده از استروئیدهای آنابولیک آندروژنیک (Androgenic Anabolic Steroids) از پنجاه سال پیش توسط ورزشکاران شروع شده است و به طور قابل توجهی در حال افزایش است (۱، ۲). استروئیدهای آنابولیک آندروژنیک، گروهی از هورمونهای سنتتیک هستند که عمدتاً از تستوسترون مشتق می‌شوند (۳). استروئیدهای آنابولیک، اثرات فیزیولوژیک متعددی در بدن برعهده دارند که مهم‌ترین آنها شامل افزایش سنتز پروتئین، افزایش حجم ماهیچه‌ای و تأثیر بر الگوی رشد استخوان‌هاست (۳)، همچنین از جمله استفاده‌های پزشکی استروئیدهای آنابولیک تحریک مغز استخوان، تحریک رشد، افزایش اشتها و همچنین افزایش حداکثر فشار دمی است (۴، ۵).

علاوه بر کاربردهای استروئیدهای آنابولیک در پزشکی، این داروها در بین ورزشکاران به منظور دوپینگ و افزایش قدرت و

آدرس نویسنده مسئول: تهران، بخش آناتومی و جنین شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، زهرا طوطیان (**email**: ztotian@ut.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۱۰/۲۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۶/۱۱/۱۱

توان عضلانی مورد استفاده نادرست قرار می‌گیرند و در حال حاضر، انواعی از داروها، مانند استروئیدهای آنابولیک برای بهبود عملکرد ورزشی در ظاهر استفاده می‌شوند (۶). تعداد زیادی از ورزشکاران و نوجوانان به منظور تناسب اندام و ظاهر خود از استروئیدهای آنابولیک آندروژنیک استفاده می‌کنند و نکته قابل توجه این است که بسیاری از ورزشکارانی که از استروئیدها استفاده می‌کنند، بر این باورند که عوارض جانبی این داروها جدی و دائمی نیست، درحالی‌که برخی پزشکان تغییرات عملکردی در کبد و اسپرم را در افراد استفاده کننده از این داروها گزارش کرده‌اند (۷، ۸). استروئیدهای آنابولیک آندروژنیک از لحاظ ساختاری مربوط به سیستم چرخه حلقه‌های استروئیدی بوده و در بدن دارای اثراتی شبیه تستوسترون هستند. این داروها پروتئین درون سلولی را به خصوص در عضلات اسکلتی افزایش می‌دهند. استروئیدهای آنابولیک دارای خواص آندروژنی و مردانگی از جمله ارتقاء و حفظ ویژگی‌های مردانه مانند رشد تارهای صوتی، بیضه و موهای بدن هستند (۳). یکی از انواع آنها Methandrostenolone (C20H28O2) می‌باشد که با اسامی تجاری Dianabol، Averbol و همچنین با نام Methandienone در بازار وجود دارد (۳). دیانابول ازجمله استروئیدهای آنابولیک آندروژنیکی است که ورزشکاران به ویژه بدنسازان از این دارو برای تناسب اندام استفاده می‌کنند. این دارو در کبد متابولیزه می‌شود و با افزایش ذخیره آب، فشار خون و ضربان قلب بالا سبب افزایش وزن می‌شود (۸).

استروئیدهای آنابولیک آندروژنیک، به ویژه دیانابول، به عنوان داروی نیروزا در بین ورزشکاران برای رشد و تقویت عضلات استفاده می‌شوند و تحقیقات زیادی در زمینه آثار روانی و فیزیولوژیک این دارو انجام شده‌اند. دیانابول موجب رشد توده عضلانی و تقویت عضلات بدن می‌شود و همچنین تخریب و مرگ سلولی را به تاخیر می‌اندازد، ولی باعث عوارضی مانند سرطان کبد، نارسایی‌های کبدی و کلیوی، نکروز کبدی، بیش ادراری، طاسی زودرس، افزایش چربی خون، بیماری‌های قلبی و به ویژه آسیب به اسپرم می‌شود (۱۱-۷). اکسیداسیون استروئیدهای آنابولیک به‌ویژه دیانابول در بدن منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن، پی‌ریزی تنش اکسیداتیو و پراکسیداسیون چربی‌ها شده و زمینه آسیب سلولی و افزایش میزان آپوپتوز را فراهم می‌آورد (۱۲).

در عصر حاضر جهت ارزیابی کارآیی ترکیبات واجد ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی در برابر آسیب‌های سلولی ناشی از عوامل اکسیدان، پژوهش‌های بی‌شماری انجام می‌پذیرد. عملکردهای فیزیولوژیک ویتامین E به عنوان یک ویتامین محلول در چربی عمدتاً مربوط به خواص کاهندگی واکنش‌های اکسیداسیون است (۱۳). ویتامین E دارای اعمال بیولوژیک مختلفی بوده و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن مهم‌ترین و بارزترین ویژگی آن به شمار می‌آید (۱۳، ۱۴). این ویتامین توانایی زیادی در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد دارد و به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی از آسیب‌های ایجاد شده توسط رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند و می‌تواند نقشی کلیدی در به تأخیر انداختن انواع بیماری‌های دژنراتیو مثل بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان، بیماری‌های التهابی، اختلالات عصبی، آب مروارید و نیز حفظ و نگهداری از سیستم ایمنی بدن داشته باشد (۱۵). در دستگاه تناسلی نر، نقش آنتی اکسیدانی این ویتامین در مهار نمودن اثرات مخرب رادیکا ل‌های آزاد در بیضه (۱۶) و اسپرم (۱۷) گزارش شده است. علاوه بر این، ویتامین E با قابلیت ذکر شده قادر است سیستم دفاعی آنتی-اکسیدان سلول‌های بیضه و اسپرم را تقویت کند (۱۸).

از آنجایی که معدودی از استروئیدهای آنابولیک توانسته‌اند با افزایش رادیکال‌های آزاد موجب تغییراتی در دستگاه تناسلی شوند، دیانابول نیز ممکن است بتواند موجب تغییراتی در عملکرد دستگاه تناسلی نر شود و شاید ویتامین E نیز بتواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی از طریق مسیر گلوتاتیون پراکسیداز عمل کرده و اثرات مثبتی در کاهش آسیب‌های احتمالی ناشی از دیانابول داشته باشد. لذا هدف از این مطالعه، بررسی اثر محافظتی ویتامین E برروی پارامترهای کیفیت اسپرم و همچنین برخی پارامترهای سرمی در موش‌های سوری تیمار شده طی یک دوره ۴۲ روزه با دیانابول بود.

مواد و روشها

حیوانات آزمایشگاهی

برای انجام این پژوهش که به صورت یک کارآزمایی تجربی تصادفی‌شده شاهددار طرح‌ریزی شده بود، ۷۲ سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی نر بالغ از نژاد NMRI با وزن ۲۵-۲۰ گرم از مرکز پرورش حیوانات دانشکده علوم دانشگاه تهران تهیه شدند. حیوانات در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دمای ۲±۲۵ سانتی گراد و رطوبت نسبی ۱۰±۵۰ درصد در قفس‌های پلی‌اتیلنی مخصوص نگهداری موش با دسترسی آزاد به آب آشامیدنی نگهداری شدند. تمامی حیوانات به صورت برابر از پیلت‌های مخصوص موش تغذیه می‌کردند. کلیه ضوابط و شرایط نگهداری و انجام آزمایش‌ها

روی حیوانات طبق دستورالعمل‌های مصوب کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران صورت پذیرفت.

تیمار حیوانات

قبل از شروع دوره تیمار، به منظور سازگاری با شرایط جدید محیط، حیوانات به مدت دو هفته نگهداری شدند و بعد از نشاندار کردن، موش‌های نر به طور تصادفی به ۸ گروه ۹ تایی به ترتیب زیر تقسیم شدند و به مدت ۴۲ روز متوالی داروهای دیانابول و ویتامین E را به صورت خوراکی از طریق گاواژ دریافت کردند:

۱- گروه کنترل (Con): حیوانات این گروه به مقدار ۰/۳ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی از طریق گاواژ دریافت کردند.

۲- گروه تجربی اول (E): این گروه فقط ویتامین E را به میزان ۱۰۰ واحد بین‌المللی به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند (۱۹).

۳- گروه تجربی دوم (D5): این گروه داروی دیانابول را به تنهایی و به میزان ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند.

۴- گروه تجربی سوم (D10): این گروه داروی دیانابول را به تنهایی و به میزان ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند.

۵- گروه تجربی چهارم (D20): حیوانات این گروه داروی دیانابول را به تنهایی و به میزان ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند.

۶- گروه تجربی پنجم (D5E): در این گروه، حیوانات ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن داروی دیانابول را به همراه ۱۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E دریافت کردند.

۷- گروه تجربی ششم (D10E): این گروه از حیوانات، ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن داروی دیانابول را به همراه ۱۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E دریافت کردند.

۸- گروه تجربی هفتم (D20E): حیوانات این گروه، ۲۰ میلی-گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن داروی دیانابول را به همراه ۱۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E دریافت کردند.

بررسی میزان تستوسترون، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم و پراکسیداسیون چربی‌ها

یک روز پس از پایان دوره تیمار ۴۲ روزه، کلیه حیوانات موجود در هشت گروه ذکر شده آسان‌کشی شدند و نمونه های خون توسط سرنگ‌های استریل به‌صورت مستقیم از قلب جمع‌آوری شدند. سپس نمونه‌های خونی در میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته شده و پس از لخته شدن خون، جهت استحصال سرم، نمونه‌ها در ۳۰۰۰ دور به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شدند. نمونه‌های سرم جدا شده تا زمان انجام آزمایش های سرمی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سرم‌ها تا زمان سنجش هورمونی به دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. برای سنجش تستوسترون، روش الایزا و رادیوایمنومتری با استفاده از کیت اختصاصی (Diaplus Inc. USA) مورد ارزیابی قرار گرفته و گروه ها با هم مقایسه شدند. سپس نمونه‌های مذکور جهت تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم (TAC) (بر اساس توان احیاء کنندگی آهن سه ظرفیتی) و پراکسیداسیون چربی‌ها(Malondialehyde (MAD (با استفاده از اندازه گیری مالون آلدئید بر پایه واکنش با تیوباربیتوریک اسید، استخراج با بوتانول نرمال، اندازه‌گیری جذب با روش اسپکتروفتومتری و مقایسه جذب با منحنی استاندارد) مورد آزمایش قرار گرفتند.

بررسی ویژگی‌های اسپرم

پس از جدا کردن قسمت اپیدیدیم و قرار دادن آن در محیط HTF، اسپرم‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. برای انجام این بررسی‌ها از هر گروه ۹ موش و از هر نمونه اسپرم ۱۰ لام برای هر رنگ آمیزی تهیه شد. بررسی‌های انجام شده شامل شمارش میانگین تعداد اسپرم در واحد حجمی و رقت ثابت با استفاده از لام نئوبار، تعیین میزان درصد تحرک اسپرم، درصد زنده بودن اسپرم (رنگ آمیزی نگروزین ائوزین)، میزان شکستگی DNA (با روش رنگ آمیزی آکریدین اورنج)، و میزان بلوغ هسته (با روش رنگ آمیزی آنیلین بلو) بود (۲۰, ۲۱).

تحلیل آماری

نتایج حاصل از این مطالعه با استفاده از بسته نرم‌افزاری SPSS نسخه ۱۹ مورد ارزیابی آماری قرار گرفتند و نتایج به صورت میانگین± انحراف معیار بیان شدند. جهت مقایسه بین گروه‌ها آنالیز واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن تست تکمیلی Tukeyمورد استفاده قرار گرفت و معیار استنتاج آماری $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

جدول ۱. مقایسه میانگین تعداد اسپرم، درصد تحرک اسپرم و درصد اسپرم‌های زنده در گروه‌های کنترل و تجربی

گروه‌ها	تعداد اسپرم (میلی لیتر/۱۰^۶)	تحرک اسپرم(٪)	میانگین اسپرم های زنده(٪)
con	۴۲/۴ ± ۲/۴۰۸	۹۰/۴ ± ۲/۳	۹۴/۲ ± ۲/۳۸۷
E	۴۵,۰۸ ± ۱/۶۵	۹۴/۸۳ ± ۱/۴۷	۹۷/۶۷ ± ۱/۶۳
D 5	۱۴/۴ ± ۱/۱۹ *#	۷۹/۶ ± ۳/۰۵ *#	۸۲/۴ ± ۲/۹۵ *#
D 10	۷/۸ ± ۱/۲ *#	۶۴,۸ ± ۲/۵۹ *#	۶۵/۲ ± ۳/۷ *#
D 20	۵ ± ۰/۷۹ *#	۴۴/۶ ± ۳/۰۵ *#	۴۶/۸ ± ۳/۱۹ *#
D 5 E	۳۲/۳۳ ± ۳/۵۶ *#+	۸۰/۵ ± ۳/۰۲ *#	۸۴/۳۳ ± ۲/۵ *#
D 10 E	۲۳/۱۶۷ ± ۲/۹۱ *#+	۶۸/۳۳ ± ۴/۲۷ *#	۷۳/۳۳ ± ۴/۵ *#+
D 20 E	۱۶/۴۲ ± ۱/۳۹ *#+	۵۹/۲ ± ۲/۳۹ *#+	۶۴/۶ ± ۲/۸۸ *#+

جدول ۲. مقایسه میانگین درصد اسپرم بالغ، درصد اسپرم های با DNA آسیب دیده و درصد اسپرم های غیرطبیعی در گروه‌های کنترل و تجربی

گروه‌ها	اسپرم ها با هسته بالغ(٪)	اسپرم ها با DNA آسیب دیده (٪)	اسپرم ها غیرطبیعی (٪)
con	۹۸/۶۷ ± ۱/۲۱	۷/۵ ± ۱/۸۷	۱۱/۱۷ ± ۱/۹۴
E	۹۸/۸۳ ± ۱/۱۷	۵/۱۷ ± ۲/۳۲	۸/۸۳ ± ۱/۴۷
D 5	۹۱/۸۳ ± ۲/۱۴ *#	۲۲/۱۷ ± ۳/۷۶ *#	۲۱/۵ ± ۱/۸۷ *#
D 10	۸۹/۶۷ ± ۲/۴۲ *#	۲۸/۳۳ ± ۲/۱۶ *#	۳۴/۵ ± ۱/۰۵ *#
D 20	۸۳/۵ ± ۱/۸۷ *#	۳۷/۸۳ ± ۳/۰۶ *#	۴۹/۵ ± ۳/۰۸ *#
D 5 E	۹۳/۶۷ ± ۲/۱۶ *#	۱۴/۱۷ ± ۱/۷۲ *#+	۱۶/۱۷ ± ۱/۴۷ *#+
D 10 E	۹۳/۱۷ ± ۱/۴۷ *#+	۱۸/۵ ± ۱/۸۷ *#+	۲۵/۱۷ ± ۲/۴۸ *#+
D 20 E	۹۰/۳۳ ± ۲/۱۶ *#+	۲۵/۵ ± ۱/۸۷ *#+	۳۶/۶۷ ± ۳/۷۸ *#+

داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند. Con: کنترل، E: ویتامین E، D5: دیانابول ۵ میلی‌گرم، D10: دیانابول ۱۰ میلی‌گرم، D20: دیانابول ۲۰ میلی‌گرم، D5E: دیانابول ۵ میلی‌گرم همراه با ویتامین E، D10E: دیانابول ۱۰ میلی‌گرم همراه با ویتامین E، D20E: دیانابول ۲۰ میلی‌گرم همراه با ویتامین E. * وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۵)، # وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه ویتامین E (P<۰/۰۵)، + وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه متناظر خود (P<۰/۰۵)

یافته‌ها

بررسی تعداد اسپرم

نتایج حاصل از شمارش اسپرم‌ها و مقایسه آنها بین گروه‌های مختلف آزمایشی و گروه کنترل نشان دادند که مصرف دیانابول سبب کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد اسپرم‌ها نسبت به گروه‌های کنترل و ویتامین E شد (P<۰/۰۵). به‌طوری‌که میانگین تعداد اسپرم‌ها در گروه‌های D5، D10 و D20 به صورت معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به گروه‌های کنترل و ویتامین E کمتر بود، این درحالی بود که گروه‌های D5E، D10E و D20E دارای اختلاف معنی‌دار با گروه‌های کنترل و ویتامین E بوده و همچنین این گروه‌ها با گروه‌های متناظر خود نیز دارای اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) بودند (جدول ۱).

ارزیابی تحرک اسپرم

نتایج حاصل از مطالعه تحرک اسپرم نشان داد که تحرک اسپرم در گروه‌های D5، D10 و D20 به صورت معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به گروه‌های کنترل و ویتامین E کاهش پیدا کرده بود، این در حالی بود که گروه‌های D5E، D10E و D20E دارای اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) با گروه‌های کنترل و ویتامین E بودند. همچنین گروه‌های D5E و D10E فاقد اختلاف معنی‌داری با گروه‌های متناظر خود بودند و تنها گروه D20E دارای اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) با گروه متناظر خود بود (جدول ۱).

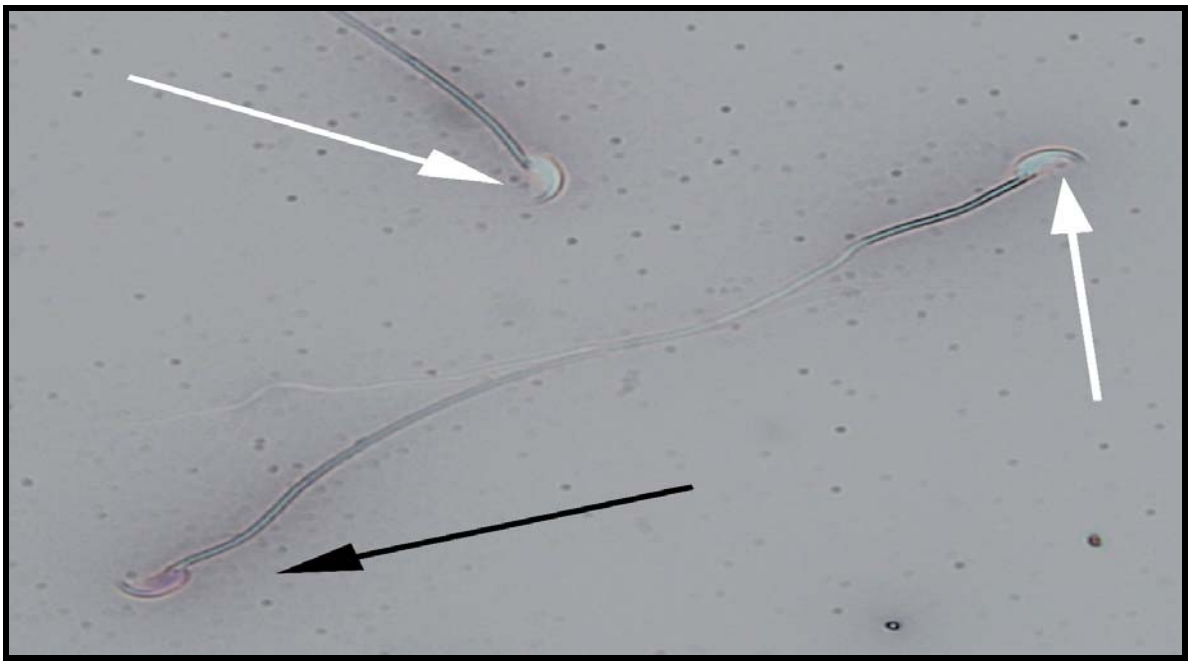
قابلیت زنده‌مانی اسپرم

نتایج حاصل از بررسی درصد اسپرم‌های زنده بیانگر این است که میانگین درصد اسپرم زنده در گروه‌های D5، D10 و D20 به صورت معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به گروه‌های کنترل و ویتامین E کاهش پیدا کرده بود. همچنین میانگین درصد اسپرم زنده در گروه‌های D5E، D10E و D20E دارای اختلاف معنی داری (P<۰/۰۵) با گروه‌های کنترل و ویتامین E بود. گروه‌های D10E و D20E دارای اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) با گروه متناظر خود بودند، ولی گروه D5E فاقد اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) با گروه متناظر خود بود (جدول ۱، شکل ۱).

جدول ۳. نتایج میانگین آزمایشات بیوشیمیایی تستوسترون، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم و مالون دی آلدئید در گروه‌های کنترل و تجربی

گروه‌ها	تستوسترون (ng/ml)	TAC (mMol/mg)	MDA (µmol/ml)
con	۶/۷۶ ± ۰/۴۸	۰/۵۶۷ ± ۰/۰۰۷	۰/۲۲۰ ± ۰/۰۰۵
E	۸/۲۱ ± ۰/۴۲ *	۰/۵۷۸ ± ۰/۰۰۸	۰/۲۲۱ ± ۰/۰۰۸
D 5	۴/۹۹ ± ۰/۲۵ *#	۰/۳۴۱ ± ۰/۰۰۸ *#	۰/۳۰۶ ± ۰/۰۰۷ *#
D 10	۳/۸۸ ± ۰/۳۷ *#	۰/۳۰۱ ± ۰/۰۱۵ *#	۰/۳۶۶ ± ۰/۰۱۳ *#
D 20	۲/۷۳ ± ۰/۲۳ *#	۰/۲۳۸ ± ۰/۰۰۷ *#	۰/۴۰۵ ± ۰/۰۱۱ *#
D 5 E	۶/۴۶ ± ۰/۲۷ *#+	۰/۴۰۱ ± ۰/۰۱ *#+	۰/۲۶۶ ± ۰/۰۱۴ *#+
D 10 E	۵/۸۶ ± ۰/۲۴ *#+	۰/۳۳۹ ± ۰/۰۱۱ *#+	۰/۳۱۳ ± ۰/۰۰۹ *#+
D 20 E	۳/۹۸ ± ۰/۲۳ *#+	۰/۳۰۵ ± ۰/۰۱۱ *#+	۰/۳۲۷ ± ۰/۱۱۲ *#+

داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند. ng/ml: نانوگرم بر میلی‌لیتر. µmol/ml: میکرومول بر میلی‌لیتر، mMol/mg: میلی‌مول بر میلی‌گرم، Con: کنترل، E: ویتامین E، D5: دیانابول ۵ میلی‌گرم، D10: دیانابول ۱۰ میلی‌گرم، D20: دیانابول ۲۰ میلی‌گرم، D5E: دیانابول ۵ میلی-گرم همراه با ویتامین E، D10E: دیانابول ۱۰ میلی‌گرم همراه با ویتامین E، D20E: دیانابول ۲۰ میلی‌گرم همراه با ویتامین E، داده ها بر اساس میانگین ± انحراف معیار بیان شده اند.* وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۵) # وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه ویتامین E (P<۰/۰۵)،+ وجود اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه متناظر خود (P<۰/۰۵)



شکل ۱. نمای ریزبینی اسپرم در رنگ آمیزی ائوزین– نگروزین. اسپرم‌های زنده با سر رنگ نگرفته (فلش سفید رنگ) و اسپرم‌های مرده با سری رنگ شده (فلش سیاه رنگ) قابل رویت هستند.

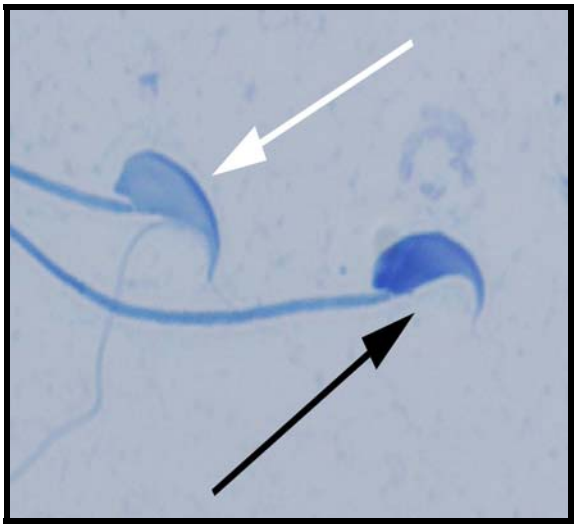
ارزیابی اسپرم‌های بالغ

ارزیابی میانگین تعداد اسپرم‌های با هسته بالغ نشان داد که اسپرماتوزوئیدها در گروه‌های D5، D10 و D20 به صورت معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به گروه‌های کنترل و ویتامین E کاهش پیدا کرده بودند. تعداد اسپرم‌ها با هسته بالغ در گروه‌های D5E، D10E و D20E نیز دارای اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) با گروه‌های کنترل و ویتامین E بود. گروه‌های D10E و D20E اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) با گروه متناظر خود داشتند (جدول ۲، شکل ۲).

ارزیابی آسیب DNA اسپرم

بررسی‌های حاصل از رنگ‌آمیزی آکریدین‌اورنج نشان دادند که درصد اسپرم‌هایی که DNA دورشته‌ای ناپیوسته (آسیب دیده) داشتند، در گروه‌های D5، D10 و D20 نسبت به گروه‌های کنترل و ویتامین E به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافته و با آنها دارای اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) بود. آسیب DNA اسپرم در

گروه‌های D5E، D10E و D20E نیز نسبت به گروه‌های کنترل و ویتامین E افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) داشتند و همچنین گروه‌های مذکور با گروه متناظر خود نیز دارای اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) بودند (جدول ۲، شکل ۳).



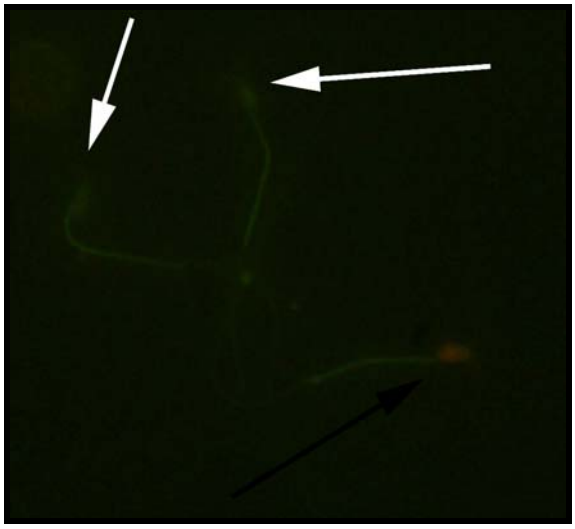
شکل ۲. نمای ریزبینی اسپرم در رنگ آمیزی آنلین بلو. اسپرم‌های با هسته بالغ با سری به رنگ آبی کم رنگ (فلش سفید رنگ) و اسپرم های با هسته نابالغ با سری به رنگ آبی پررنگ (فلش سیاه رنگ) دیده می‌شوند.

بررسی میزان اسپرم‌های غیرطبیعی

میانگین میزان اسپرم‌های غیرطبیعی در گروه‌های D5، D10 و D20 نسبت به گروه‌های کنترل و ویتامین E افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) داشت. همچنین گروه‌های D5E، D10E و D20E نیز نسبت به گروه‌های کنترل و ویتامین E افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) در میزان اسپرم‌های غیرطبیعی داشتند. از میان این گروه‌ها، نیز گروه‌های D5E، D10E و D20E دارای اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) با گروه متناظر خود بودند (جدول ۲).

ارزیابی حاصل از سنجش هورمون‌تستوسترون

بررسی میزان هورمون تستوسترون در گروه‌های مختلف نشان داد که میزان این هورمون در گروه‌های D5، D10 و D20 با گروه‌های کنترل و ویتامین E دارای کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) بوده و گروه ویتامین E نیز افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) در سطح هورمون تستوسترون با گروه کنترل داشت. سطح هورمون تستوسترون در گروه‌های D10E و D20E نیز نسبت به گروه‌های کنترل و ویتامین E اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) داشته و گروه D5E فقط دارای اختلاف معنی‌دار با گروه ویتامین E بود. همچنین گروه‌های D5E، D10E و D20E افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) در سطح هورمون تستوسترون با گروه متناظر خود داشتند (جدول ۳).



شکل ۳. نمای ریزبینی اسپرم در رنگ آمیزی آکریدین اورنج، اسپرم های با DNA سالم با سر سبز رنگ (فلش سفید رنگ) و اسپرم های با آسیب DNA با سر قرمز رنگ (فلش سیاه رنگ).

سنجش میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم TAC:

سنجش میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم در گروه‌های مختلف نشان داد که سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم در گروه‌های D5، D10 و D20 با کنترل و ویتامین E دارای کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) بودند. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم در گروه‌های D5E، D10E و D20E نسبت به گروه‌های کنترل و ویتامین E دارای اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) بوده و همچنین گروه‌های مذکور افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) در سطح آنتی‌اکسیدانی تام سرم در مقایسه با گروه متناظر خود داشتند (جدول ۳).

سنجش میزان مالون دی آلدئید MDA:

بررسی میزان پراکسیداسیون چربی‌ها در حیوانات نشان داد که تجویز دیانابول در گروه‌های D5، D10 و D20 باعث افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) با گروه کنترل و ویتامین E شد. همچنین سطح مالون دی آلدئید در گروه‌های D5E، D10E و D20E در مقایسه با گروه‌های کنترل و ویتامین E اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) داشت. گروه‌های D5E، D10E و D20E دارای کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) در

سطح مالون دی آلدئید خود در مقایسه با گروه متناظر خود بودند (جدول ۳).

بحث

داروهای استروئید آنابولیک مانند دیانابول در بین ورزشکاران به عنوان داروی نیروزا برای رشد و تقویت عضلات استفاده می‌شوند. تحقیقات زیادی در زمینه آثار روانی و فیزیولوژیک این داروها انجام شده است. داروهای استروئید آنابولیک تخریب و مرگ سلولی را به تاخیر می‌اندازند، ولی باعث عوارضی در دستگاه تولید مثل می‌شوند (۷). سوء استفاده از داروهای استروئید آنابولیک آندروژنیک توسط محققان بسیاری مورد توجه قرار گرفته است، زیرا این داروها وابسته به زمان و مقدار مصرف با آسیب‌های جبران ناپذیری ازجمله ناباروری در مردان مرتبط هستند (۲۲). اگرچه مکانیسم دقیق آسیب شناسی داروهای استروئید آنابولیک بر سمیت دستگاه تولید مثلی مردان هنوز کاملا شناخته نشده است، با این حال یافته‌ها حاکی از این است که داروهای استروئید آنابولیک منجر به ایجاد بیماری هیپوگنادیسم هیپوگنادوتروپیک همراه با کاهش میزان سطح تستوسترون خون شده و تغییرات در محور- هیپوتالاموس- هیپوفیز گنادی را منجر می‌شود (۲۳، ۲۴). در مطالعه حاضر، موش‌های نر دریافت کننده دیانابول دچار اختلال در پارامترهای کیفیت اسپرم بودند که این نتایج تاییدی بر مطالعات قبلی است که نشان می‌دهد که داروهای استروئید آنابولیک باعث الیگواسپرمی و آزواسپرمی شدید شده و دارای اثرات مخرب بر روی اسپرم هستند (۲۵، ۲۶). اسپرماتوژنز فرآیند بسیار پیچیده‌ای است که در آن سلول‌های جنسی نابالغ (MGCs) به اسپرم‌های بالغ متمایز می‌شوند (۲۷). سلول سرتولی به عنوان یک سلول سوماتیک تخصص یافته، نقش مهمی در حفظ، تکثیر و بلوغ سلول‌های جنسی نابالغ دارد (۲۸). علاوه بر این، گزارش حاکی از این است که داروهای استروئید آنابولیک باعث کاهش تستوسترون سرم و گلوبولین اتصال دهنده هورمون جنسی از طریق اشغال جایگاه گیرنده آندروژنی در این سلول‌ها می‌شوند (۲۹). بنابراین، شکست فرآیند اسپرمیوژنز در موش‌های دریافت کننده دیانابول ممکن است از طریق اختلال در اتصال تستوسترون به گیرنده‌های سلول‌های سرتولی و تاثیر آن در سلول‌های جنسی نابالغ توضیح داده شود. از سوی دیگر، به وضوح مشخص شده است که دریافت دیانابول باعث آسیب به غشای میتوکندریایی می‌شود، که منجر به بیش تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) شده و باعث ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود (۳۰). شواهد حاکی از آن است که استرس اکسیداتیو می‌تواند اختلالات اسپرمی را از طریق مکانیسم‌های مختلفی از قبیل پراکسیدلسیون لیپیدی غشای پلاسمایی اسپرم، اختلال در تحرک و مورفولوژی اسپرم و القای شکستگی در DNA اسپرم ایجاد نماید (۳۱، ۳۲). همچنین، مطالعات نشان می‌دهند که آسیب DNA اسپرم ناشی از استرس اکسیداتیو، باعث افزایش روند آپوپتوز سلول‌های جنسی نابالغ می شود که منجر به کاهش غلظت اسپرم می‌شود (۳۳). در همین راستا، مطالعه ما نیز نشان داد که استفاده از دیانابول باعث افزایش آسیب DNA اسپرم توسط مکانسیم‌های دخیل در استرس اکسیداتیو می‌شود.

پیشتر نشان داده شده است که استفاده از داروهای استروئید آنابولیک سبب کاهش تعداد اسپرم می‌شود (۳۴). فاکتور رشد نقش بسیار مهمی‌در تنظیم پاراکرین و اتوکرین عملکرد بیضه در تقسیمات سلولی دارد. در بیضه فاکتور رشد (IGF-I) از سلول‌های سرتولی و لیدیگ تحت کنترل LH وFSH ، ترشح می‌شود (۳۵). گیرنده‌های IGF-I بر روی سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و اسپرماتوزوآ قرار دارد (۳۶). گفته شده است که IGF-I، فاکتور حیاتی در پیشرفت سلول‌های جنسی نابالغ، بلوغ و تحرک اسپرماتوزوئید بوده (۳۶) و با توجه به یافته‌های پیشین داروهای استروئید آنابولیک مانند دیانابول بر روی محور هیپوتالاموس– هیپوفیز– گنادی تاثیر داشته و باعث کاهش در ترشح گنادوتروپین‌ها می‌شود که در نهایت منجر به کاهش تعداد، تحرک و بلوغ اسپرم می‌شود (۳۷). همچنین در مطالعه حاضر مشخص شد که دیانابول باعث افزایش آسیب DNA هسته اسپرم می‌شود، همچنان که پژوهش‌های پیشین نیز نشان داده‌اند که آسیب DNA اسپرم می‌تواند منجربه اختلال در باروری یا اثرات مخرب بر رشد و نمو جنین شود (۳۸).

در مطالعه حاضر، دیانابول سبب کاهش تعداد اسپرم، کاهش تحرک اسپرم، کاهش بلوغ اسپرم و نیز کاهش اسپرم‌های زنده و همچنین افزایش معنی‌دار آسیب DNA هسته اسپرم شد که این نتایج با مطالعات دیگری که نشان دادند داروهای استروئید آنابولیک با تاثیرات مخرب بر شاخص‌های کیفیت اسپرم میگردد، هم‌راستا است (۳۹). ویتامین E نوعی آنتی اکسیدان قوی است که نقش محافظتی این ویتامین در کیفیت و کمیت اسپرم، لقاح و باروری در انسان‌ها گزارش شده است (۴۰). ویتامین E با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود، از آسیب اسیدهای چرب غیراشباع بافتی در برابر رادیکال‌های آزاد و

پراکسیداسیون لیپیدی ممانعت می‌کند و باعث پایداری غشای سلول‌ها می‌شود (۴۰). ویتامین E پراکسیداسیون لیپیدی را در میتوکندری و میکروزوم بیضه مهار کرده، اثرات مخرب استرس اکسیداتیو ناشی از عوامل استرس زا را کاهش می‌دهد و با افزایش کیفیت اسپرم، باعث بهبود پارامترهای مختلف باروری می‌شوند (۴۱، ۴۲). در این مطالعه، ویتامین E با توجه به داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی توانست افزایش معنی‌داری در تعداد اسپرم، تحرک اسپرم، زنده‌مانی اسپرم و بلوغ اسپرم و کاهش معنی‌داری در درصد آسیب DNA هسته اسپرم و اسپرم‌های غیر طبیعی ایجاد کند که این یافته‌ها با مطالعات قبلی حمایت می‌شوند (۴۰). بنابراین، مهم‌ترین اثر درمانی ویتامین E خاصیت آنتی اکسیدانتی آن است. گزارش شده است که کاهش تعداد اسپرم اغلب نتیجه تداخل در روند اسپرماتوژنز و حذف سلول‌های اسپرم در مراحل مختلف اسپرماتوژنز است. خاصیت آنتی‌آپوپتوتیک، آنتی‌فیبروتیک، آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی ویتامین E موجب بهبود تعداد و تحرک اسپرم می‌شود (۴۰، ۴۳). در مورد زنده‌مانی اسپرم نشان داده شده است که آنالوگی محلول در آب از ویتامین E باعث افزایش قدرت زنده‌مانی اسپرم از طریق بهبود فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی اسپرم شامل سوپراکسید دسموتاز، گلوتاتیون پروکسیداز وکاتالاز نقش بارزی در افزایش قدرت زنده‌مانی و تحرک اسپرم ایفا می‌کند (۴۴). لذا نتایج حاصل از مطالعه فوق با مطالعات تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. در این مطالعه، دریافت دیانابول باعث افزایش میزان اسپرم‌های غیرطبیعی شده است. در همین راستا گفته شده است که اختلال در سلول‌های سرتولی و به تبع آن اختلال در روند اسپرمیوژنز، باعث تولید اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی می‌شود که ثابت شده است بین میزان تولید گونه های فعال اکسیژن و آسیب به سلول‌های سرتولی و طی آن تولید اسپرم-های غیرطبیعی رابطه مستقیمی وجود دارد (۴۵، ۴۶). دریافت ویتامین E باعث کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن شده و از این طریق از میزان اسپرم‌های غیرطبیعی می‌کاهد که با نتایج حاصل از این مطالعه همخوانی دارد (۴۷).

نتایج گزارشات حاکی از این است که استروئیدهای آنابولیک با اشغال کردن رسپتورهای آندروژنیک و در نتیجه ایجاد بازخورد منفی در مغز و محور هیپوتاموس– هیپوفیز– گنادی منجربه کاهش غلظت تستوسترون ، LH وFSH می‌شوند (۴۸). بررسی‌ها در این مطالعه نشان داد که دیانابول سبب کاهش معنی‌دار تستوسترون در مقایسه با گروه کنترل گشته که این کاهش را می‌توان به ایجاد بازخورد منفی ایجاد شده توسط دیانابول در محور هیپوفیز– هیپوتالاموس– گنادی، نسبت داد. در این بررسی ویتامین E توانست سبب افزایش معنی‌دار سطح تستوسترون پلاسما در مقایسه با گروه دیانابول شود، که این بهبود در سطح تستوسترون توسط دیانابول را می‌توان ناشی از خاصیت آنتی اکسیدانی ویتامین E دانست (۴۰). عقیده بر این است که گونه های فعال اکسیژن باعث القای پراکسیداسیون لیپیدی در غشاء اسپرم شده و پراکسیداسیون اسیدهای چرب ناشی از آن دارای اثرات سمی بر روی اسپرم است که منجر به کاهش عملکرد اسپرم می‌شود (۳۳، ۴۹). در طی مسیر پراکسیداسیون لیپیدی چندین محصول تولید می‌شود که مهم‌ترین آنها مالون‌دی‌آلدئید (MDA) است (۵۰). بیشترین بیومارکری که در بررسی پراکسیداسیون لیپیدی در اسپرم‌ها بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد، مالون‌دی‌آلدئید است که مولکول‌های مالون دی آلدئید با نفوذ به درون ساختار غشاء سلول موجب عدم تقارن در توزیع اجزای لیپیدی غشا می‌شوند. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که میزان MDA پلاسمای سمینال دارای همبستگی معکوسی با میزان تحرک اسپرم است (۵۰، ۵۱) .علاوه براین با ایجاد پیوندهای محکم با DNA سلول، موجب بروز صدمات و شکستگی‌هایی درکروموزوم می‌شوند (۵۲). همچنین وجود رابطه معکوس بین غلظت MDA و میزان چسبندگی اسپرم به سلول تخمک توسط ایتکن و همکاران به اثبات رسیده است. بنابراین وجود ROS و مالون‌دی‌آلدئید باعث کاهش کیفیت اسپرم می‌شود (۵۲). نتایج بررسی در این مطالعه نشان داد که دیانابول سبب افزایش معنی‌دار سطح مالون‌دی‌آلدئید در مقایسه با گروه کنترل شد که این افزایش MDA سبب کاهش تحرک اسپرم، کاهش فعالیت اسپرم و در نتیجه کاهش باروری در جنس نر می‌شود، اما ویتامین E سبب کاهش معنی‌دار سطح مالون‌دی‌آلدئید در مقایسه با گروه دیانابول شد. در واقع ویتامین E سبب مهار NADPH اکسیداز که واسطه تولید آنیون سوپراکساید است، می‌شود و غشا را برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند (۵۳). اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد توسط سیستم آنتی‌اکسیدان درون سلولی کنترل و یا مهار می‌شود و در بدن دو نوع آنتی‌اکسیدان وجود دارد. نخست آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی‌که به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند و قادرند ROS را خنثی کرده و ساختار سلولی را از صدمه ناشی از آن محافظت کنند و دیگری آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی‌که در واقع آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک یا مکمل‌های غذایی هستند (۵۴). وجود آنتی‌اکسیدان‌ها جهت مقابله با خطر گونه‌های فعال اکسیژن

برای بقا و عملکرد درست اسپرماتوزوئیدها، لازم و ضروری است (۵۵). بررسی‌ها در این مطالعه نشان دادند که دیانابول سبب کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در مقایسه با گروه کنترل شد که نتیجه این کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را در کاهش تعداد، تحرک، بلوغ و زنده‌مانی اسپرم و همچنین افزایش درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و آسیب DNA اسپرم در این بررسی مشاهده شد. در این مطالعه ویتامین E سبب افزایش معنی‌دار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در مقایسه با گروه دیانابول شد، زیرا دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار زیادی در مقابل انواع گونه‌های فعال اکسیژن از قبیل آنیون سوپراکسید و هیدروکسیل است (۵۶).

با جمع بندی یافته‌های مطالعه حاضر چنین بر می‌آید که دیانابول به واسطه افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، پی‌ریزی تنش‌های اکسیداتیو و نیز تضعیف دستگاه دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن، موجبات اختلالات مربوط به پارامترهای سرمی و کیفیت اسپرم را در موش فراهم می‌آورد. درحالی‌که ویتامین E به موجب قابلیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی، عوارض ناشی از تجویز دیانابول را در دستگاه تولیدمثل موش نر کاهش می‌دهد. با این وجود، تایید کارایی درمانی ویتامین E در موارد بالینی آسیب‌های دستگاه تولیدمثلی ناشی از دیانابول نیازمند طرح‌ریزی مطالعات تجربی گسترده‌تر و نیز کارآزمایی های بالینی است.

تشکر و قدردانی

نگارندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند، مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران به سبب حمایت‌هایشان از این مطالعه اعلام دارند.

REFERENCES

1. Hershberger LG, Shipley EG, Meyer RK. Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY) 1953;83:175-80.

2. Wade N. Anabolic Steroids: Doctors Denounce Them, but Athletes Aren't Listening. Science 1972;176:1399-1403.

3. Hartgens F, Kuipers H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. Sports Med 2004;34:513-54.

4. Clark AS, Harrold EV, Fast AS. Anabolic-androgenic steroid effects on the sexual behavior of intact male rats. Horm Behav 1997;31:35-46.

5. Pope HG Jr, Katz DL. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use. A controlled study of 160 athletes. Arch Gen Psychiatry 1994;51:375-82.

6. Bahrke MS, Yesalis CE, Wright JE. Psychological and behavioural effects of endogenous testosterone and anabolic-androgenic steroids. Sports Med1996;22:367-90.

7. Torres-Calleja J, Gonzalez-Unzaga M, DeCelis-Carrillo R, Calzada-Sanchez L, Pedron N. Effect of androgenic anabolic steroids on sperm quality and serum hormone levels in adult male bodybuilders. Life Sci 2001;68:1769-74.

8. Machado MV, Cortez-Pinto H. The dark side of sports: using steroids may harm your liver. Liver Int 2011;31:280-1.

9. Sanchez-Osorio M, Duarte-Rojo A, Martinez-Benitez B, Torre A, Uribe M. Anabolic-androgenic steroids and liver injury. Liver Int 2008;28:278-82.

10. Sale GE, Lerner KG. Multiple tumors after androgen therapy. Arch Pathol Lab Med 1977;101:600-3.

11. Velazquez I, Alter BP. Androgens and liver tumors: Fanconi's anemia and non-Fanconi's conditions. Am J Hematol 2004;77:257-67.

12. Pomara C, Neri M, Bello S, Fiore C, Riezzo I, Turillazzi E. Neurotoxicity by Synthetic Androgen Steroids: Oxidative Stress, Apoptosis, and Neuropathology: A Review. Curr Neuropharmacol 2015;13:132-45.

13. Al-Attar AM. Antioxidant effect of vitamin E treatment on some heavy metals-induced renal and testicular injuries in male mice. Saudi J Biol Sci 2011;18:63-72.

14. Zingg JM, Azzi A. Non-antioxidant activities of vitamin E. Curr Med Chem 2004;11:1113-33.

15. Bramley PM, Elmadfa I, Kafatos A, Kelly FJ, Manios YR, HE SW, et al. vitamin E. J Sci Food Agric 2000;80:913-38.

16. Chandra AK, Chatterjee A, Ghosh R, Sarkar M. Vitamin E-supplementation protect chromium (VI)-induced spermatogenic and steroidogenic disorders in testicular tissues of rats. Food Chem Toxicol 2010;48:972-9.

17. Latchoumycandane C, Mathur PP. Effects of vitamin E on reactive oxygen species-mediated 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in rat testis. J Appl Toxicol 2002;22:345-51.

18. Yue D, Yan L, Luo H, Xu X, Jin X. Effect of Vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. Anim Reprod Sci 2010;118:217-22.

19. Zarei L, Sadrkhanlou R, Shahrooz R, Malekinejad H, Eilkhanizadeh B, Ahmadi A. Protective effects of vitamin E and Cornus mas fruit extract on methotrexate-induced cytotoxicity in sperms of adult mice. Vet Res Forum 2014;5:21-7.

20. 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;27:901-10.

21. Rezvanfar MA, Rezvanfar MA, Shahverdi AR, Ahmadi A, Baeeri M, Mohammadirad A, et al. Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity, DNA damage and chromatin abnormality by selenium nano-particles. Toxicol Appl Pharmacol 2013;266:356-65.

22. Bahrke MS, Yesalis CE. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. Curr Opin Pharmacol 2004;4:614-20.

23. Feinberg MJ, Lumia AR, McGinnis MY. The effect of anabolicandrogenic steroids on sexual behavior and reproductive tissues in male rats. Physiol Behav 1997;62:23-30.

24. Takahashi M, Tatsugi Y, Kohno T. Endocrinological and pathological effects of anabolic-androgenic steroid in male rats. Endocr J 2004;51:425-34.

25. Torres-Calleja J, González-Unzaga M, DeCelis-Carrillo R, Calzada-Sánchez L, Pedrón N. Effect of androgenic anabolic steroids on sperm quality and serum hormone levels in adult male bodybuilders. Life Sci 2001;68:1769-74.

26. Karila T, Hovatta O, Seppala T. Concomitant abuse of anabolic androgenic steroids and human chorionic gonadotrophin impairs spermatogenesis in power athletes. Int J Sports Med 2004;25:257-63.

27. Hess RA, Cooke PS, Hofmann MC, Murphy KM. Mechanistic insights into the regulation of the spermatogonial stem cell niche. Cell Cycle 2006;5:1164-70.

28. Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. Endocr Rev 2004;25:747-806.

29. Sader MA, Griffiths KA, McCredie RJ, Handelsman DJ, Celermajer DS. Androgenic anabolic steroids and arterial structure and function in male bodybuilders. J Am Coll Cardiol 2001;37:224-30.

30. Nesterin MF, Budik VM, Narodetskaia RV, Solov'eva GI, Stoianova VG. Effect of methandrostenolone on liver morphology and enzymatic activity. Farmakol Toksikol 1980;43:597-601.

31. Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. Am J Reprod Immunol 2008;59:2-11.

32. Agarwal A, Sharma RK, Desai NR, Prabakaran S, Tavares A, Sabanegh E. Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. Urology 2009;73:461-9.

33. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil Steril 2003;79:829-43.

34. Harkness RA, Kilshaw BH, Hobson BM. Effects of large doses of anabolic steroids. Br J Sports Med 1975;9:70-3.

35. Lejeune H, Chuzel F, Thomas T, Avallet O, Habert R, Durand P, et al. [Paracrine regulation of Leydig cells]. Ann Endocrinol (Paris) 1996;57:55-63.

36. Henricks DM, Kouba AJ, Lackey BR, Boone WR, Gray SL. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. Biol Reprod 1998;59:330-7.

37. Klaiber EL, Henzl MR, Lloyd CW, Segre EJ. Corpus Luteum-Inhibiting Action of Oxymetholone. J Clin Endocrinol Metab 1973;36:142-7.

38. Singer TM, Yauk CL. Germ cell mutagens: risk assessment challenges in the 21st century. Environ Mol Mutagen 2010;51:919-28.

39. Shalizar Jalali A, 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;13:15-22.

40. Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, Ghozzi H, Hammami S, et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. Arch Androl 2003;49:83-94.

41. Lucesoli F, Fraga CG. Oxidative stress in testes of rats subjected to chronic iron intoxication and alpha-tocopherol supplementation. Toxicology 1999;132:179-86.

42. Senthil kumar J, Banudevi S, Sharmila M, Murugesan P, Srinivasan N, Balasubramanian K, et al. Effects of Vitamin C and E on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress, androgen binding protein and lactate in rat Sertoli cells. Reprod Toxicol 2004;19:201-8.

43. Abdel Aziz AH, Shouman SA, Attia AS, Saad SF. A study on the reproductive toxicity of erythrosine in male mice. Pharmacol Res 1997;35:457-62.

44. Pena FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. Anim Reprod Sci 2003;78:85-98.

45. Suzuki N, Sofikitis N. Protective effects of antioxidants on testicular functions of varicocelized rats. Yonago Acta Medica 1999;42:87-94.

46. Venkatesh S, Gurdeep Singh M, Prasad Gupta N, Kumar R, Deecaraman M, Dada R. Correlation of sperm morphology and oxidative stress in infertile men. Int J Reprod Biomed 2009;7:29-34.

47. Zahmatkesh E, Najafi G, Nejati V, Heidari R. Protective effect of royal jelly on the sperm parameters and testosterone level and lipid peroxidation in adult mice treated with oxymetholone. AJP 2014;4:43-52.

48. Schurmeyer T, Knuth UA, Belkien L, Nieschlag E. Reversible azoospermia induced by the anabolic steroid 19-nortestosterone. Lancet 1984;1:417-20.

49. Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. Urol Clin North Am 2002;29:817-27.

50. Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. Int J Androl 1998;21:81-94.

51. Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, Ghozzi H, Hammami S, et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. Arch Androl 2003;49:83-94.

52. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. Urology 1996;48:835-50.

53. Pascoe GA, Fariss MW, Olafsdottir K, Reed DJ. A role of vitamin E in protection against cell injury. Maintenance of intracellular glutathione precursors and biosynthesis. Eur J Biochem 1987;166:241-7.

54. Cassano E, Tosto L, Balestrieri M, Zicarelli L, Abrescia P. Antioxidant defense in the follicular fluid of water buffalo. Cell Physiol Biochem 1999;9:106-16.

55. Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. Asian J Androl 2004;6:59-65.

56. Nagai T, Inoue R, Suzuki N, Nagashima T. Antioxidant properties of enzymatic hydrolysates from royal jelly. J Med Food 2006;9:363-7.