

“Research article”

 DOI: 10.71499/jvcp.2025.1197270

## Study on the protective effects of Astaxanthin on heat-induced testicular damage and dysfunction in Wistar rats

Bagheri, T.<sup>1</sup>, Tehrani, A.A.<sup>2\*</sup>, Doustar, Y.<sup>3</sup>

1- Resident of Pathobiology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

2- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

3- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

\*Corresponding author's email: Aa.thr1957@gmail.com

(Received: 2025/2/9 Accepted: 2025/7/3)

### Extended Abstract

**Background and Objective:** Male infertility represents a significant challenge in reproductive health, with substantial medical and socioeconomic implications. In 30–50% of infertile couples, the underlying cause is attributed to male factors. Heat stress is a well-recognized risk factor that disrupts spermatogenesis and impairs fertility. This condition elevates testicular temperature, stimulates the production of reactive oxygen species (ROS), and induces oxidative stress, ultimately leading to structural and functional damage to testicular tissue. Oxidative stress not only triggers apoptosis in germinal cells but also reduces testosterone production, disrupts sperm morphology, and contributes to infertility. Among natural compounds, astaxanthin, a carotenoid with exceptionally potent antioxidant properties, has demonstrated the potential to mitigate such damage. Nevertheless, no comprehensive study has yet evaluated the protective effects of astaxanthin against heat stress, induced testicular injury in animal models. Therefore, this study was designed and conducted to assess the protective role of astaxanthin in ameliorating testicular histological damage, spermatogenic disruption, and oxidative–antioxidative imbalance caused by heat stress in Wistar rats.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 40 male Wistar rats were randomly divided into four equal groups (n = 10 each): (1) control group without heat stress, (2) heat stress group, (3) heat stress group treated daily with a low dose of astaxanthin (0.5 mg/kg/day), and (4) heat stress group treated daily with a high dose of astaxanthin (1 mg/kg/day). Heat stress was induced by immersing the scrotum in a 42°C water bath for 20 minutes, while the control group underwent immersion at ambient temperature (23°C). Astaxanthin was administered orally via gavage in 0.2 mL olive oil daily for 8 weeks. At the end of the experimental period, blood samples were collected to measure serum testosterone levels. The left testis was harvested to assess total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS), and oxidative stress index

(OSI= TOS/TAS). The right testis was used for histopathological evaluation, Johnsen scoring (to assess spermatogenesis), and Cosentino grading (to evaluate tissue damage). Data were analyzed using one-way ANOVA, Tukey's post hoc test, and Kruskal-Wallis test in SPSS software (version 25). A  $p$ -value $<0.05$  was considered statistically significant.

**Findings:** Heat stress significantly decreased serum testosterone levels and significantly increased TOS and OSI while decreasing TAS in testicular tissue ( $p<0.01$ ). Conversely, astaxanthin treatment, particularly at the higher dose, significantly elevated serum testosterone and TAS levels and significantly reduced TOS and OSI ( $p<0.01$ ). Moreover, Johnsen scores in astaxanthin-treated groups were significantly higher than in the heat stress group, indicating improved spermatogenesis. Histopathological findings further revealed that astaxanthin, especially at 1 mg/kg/day, reduced testicular tissue damage in a dose-dependent manner and restored the structural integrity of seminiferous tubules to near-normal levels observed in the control group.

**Conclusion:** Astaxanthin, owing to its strong antioxidant properties, effectively mitigates heat stress-induced testicular damage in Wistar rats by reducing oxidative stress, improving antioxidant balance, increasing testosterone levels, and preserving the histological architecture of seminiferous tubules. These effects were dose-dependent, with the 1 mg/kg/day dose yielding superior outcomes compared to 0.5 mg/kg/day. The findings suggest that astaxanthin could serve as a promising protective agent in conditions involving testicular exposure to heat stress. However, further studies employing biochemical, molecular, and immunohistochemical approaches are recommended to confirm these findings and explore its potential clinical applications.

**Keywords:** heat stress, testis, astaxanthin, Wistar rat, oxidative stress, spermatogenesis, testosterone.

**Conflict of interest:** None declared.



DOI: 10.71499/jvcp.2025.1197270

"مقاله پژوهشی"

## مطالعه اثرات محافظتی آستاگزانتین بر آسیب و اختلال عملکرد بیضه ناشی از استرس گرما در موش‌های صحرائی نژاد ویستار

طاها باقری<sup>۱</sup>، علی اصغر طهرانی<sup>۲\*</sup>، یوسف دوستار<sup>۳</sup>

۱- دستیار پاتوبیولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۳- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

\*نویسنده مسئول مکاتبات: Aa.thr1957@gmail.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱۱/۲۱ پذیرش نهایی: ۱۴۰۴/۴/۲)

### چکیده مبسوط

زمینه و هدف: ناباروری مردان به‌عنوان یکی از چالش‌های مهم در سلامت تولیدمثلی، ابعاد پزشکی و اقتصادی دارد و در ۳۰ تا ۵۰ درصد از موارد ناباروری زوجین، دلیل آن مرتبط با عوامل مردانه است. استرس گرما یکی از عوامل خطرزا برای اختلال در اسپرماتوژنز و کاهش باروری است؛ این پدیده با افزایش دمای بیضه، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و القای استرس اکسیداتیو، منجر به آسیب ساختاری و عملکردی بافت بیضه می‌شود. استرس اکسیداتیو علاوه بر القای آپوپتوز سلول‌های زایا، باعث کاهش تولید تستوسترون، اختلال در مورفولوژی اسپرم و ناباروری می‌گردد. در این میان، آستاگزانتین به‌عنوان یک کاروتنوئید طبیعی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی فوق‌العاده قوی، قابلیت تعدیل چنین آسیب‌هایی را دارد. با این حال، تاکنون مطالعه‌ای جامع در مورد اثرات محافظتی آستاگزانتین بر آسیب ناشی از استرس گرما در بافت بیضه در مدل‌های حیوانی انجام نشده بود. از این رو، این مطالعه با هدف ارزیابی اثر محافظتی آستاگزانتین در بهبود آسیب بافتی، اختلال در اسپرماتوژنز و تعادل اکسیداتیو-آنتی‌اکسیداتیو ناشی از استرس گرما در موش‌های صحرائی نژاد ویستار طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۴۰ سر موش نر نژاد ویستار به‌صورت تصادفی در چهار گروه ده‌تایی تقسیم شدند: (۱) گروه شاهد بدون استرس گرما، (۲) گروه تحت استرس گرما، (۳) گروه تحت استرس گرما به‌همراه تیمار روزانه با دز پایین آستاگزانتین (۰/۵ mg/kg/day) و (۴) گروه تحت استرس گرما به‌همراه تیمار روزانه با دز بالای آستاگزانتین (۱ mg/kg/day). استرس گرما با غوطه‌وری کیسه بیضه در حمام آب ۴۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه القا گردید، در حالی که گروه شاهد در دمای محیطی (۲۳

درجه) قرار گرفت. تیمار با آستاگزانتین از طریق گاوآژ خوراکی به‌همراه روغن زیتون به‌مدت ۸ هفته ادامه یافت. در پایان دوره، نمونه‌های خون برای اندازه‌گیری سطح سرمی تستوسترون، بافت بیضه چپ جهت ارزیابی وضعیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAS)، وضعیت اکسیدانی کل (TOS) و شاخص استرس اکسیداتیو (OSI) و بافت بیضه راست برای بررسی‌های هیستوپاتولوژیک، امتیازدهی جانسن (برای ارزیابی اسپرماتوژنز) و سیستم درجه‌بندی کازتینو (برای ارزیابی آسیب بافتی) مورد استفاده قرار گرفت. تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آزمون‌های One-way ANOVA، Tukey و Kruskal-Wallis در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ انجام شد.

یافته‌ها: استرس گرما منجر به کاهش معنی‌دار سطح تستوسترون سرمی، افزایش TOS و OSI و کاهش TAS در بافت بیضه شد ( $p < 0/01$ ). از سوی دیگر، تیمار با آستاگزانتین (به‌ویژه در دز بالا) به‌طور معنی‌داری سطح تستوسترون و TAS را افزایش داده و مقادیر TOS و OSI را کاهش بخشید ( $p < 0/01$ ). همچنین، امتیاز جانسن در گروه‌های تیمار شده با آستاگزانتین به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه استرس گرما بود و نشان‌دهنده بهبود اسپرماتوژنز بود. یافته‌های هیستوپاتولوژیک نیز نشان داد که آستاگزانتین، به‌ویژه در دز ۱ mg/kg/day آسیب بافتی را به‌صورت وابسته به دز کاهش داده و ساختار بافتی توبول‌های اسپرم‌ساز را تا حد نزدیک به گروه شاهد بهبود بخشید.

نتیجه‌گیری: آستاگزانتین با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی خود، قادر است آسیب‌های ناشی از استرس گرما در بافت بیضه موش‌های صحرایی را از طریق کاهش استرس اکسیداتیو، بهبود تعادل آنتی‌اکسیدانی، افزایش سطح تستوسترون و حفظ ساختار بافتی توبول‌های اسپرم‌ساز تعدیل کند. این اثرات به‌صورت دز-وابسته مشاهده شد و دز ۱ mg/kg/day نتایج بهتری در مقایسه با دز ۰/۵ mg/kg/day داشت. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که آستاگزانتین می‌تواند به‌عنوان یک عامل محافظتی بالقوه در شرایطی که بیضه در معرض استرس گرمایی قرار می‌گیرد، مورد توجه قرار گیرد. با این حال، برای تأیید یافته‌ها و کاربرد بالینی آن، مطالعات بیشتری با رویکردهای بیوشیمیایی، مولکولی و ایمونوهیستوشیمیایی توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: استرس گرما، بیضه، آستاگزانتین، موش صحرایی، استرس اکسیداتیو، اسپرماتوژنز، تستوسترون.

## مقدمه

ناباروری به عنوان عدم باروری پس از حداقل ۱۲ ماه رابطه جنسی منظم و محافظت نشده در زوجین تعریف می‌شود. ناباروری مردان ۳۰ تا ۵۰ درصد موارد ناباروری را تشکیل می‌دهد. شرایط مختلف فیزیولوژیکی، آسیب‌های پاتولوژیک سیستمیک، ناهنجاری‌های ژنتیکی، آلودگی‌های محیطی و حتی استرس‌های اکسیداتیو اندام‌های تولید مثل می‌توانند باعث ناباروری شوند ( Abdollahzadeh Soreshjani and Ashrafzadeh, 2018). اسپرم‌زایی طبیعی یکی از حساس‌ترین پارامترهای تولید مثلی است و اختلال در تنظیم حرارت کیسه بیضه ممکن است منجر به اختلال در اسپرم‌زایی و ناباروری موقت یا دائمی مردان شود (Zhang et al., 2020).

استرس گرمایی می‌تواند سلول‌های بیضه را تحت تأثیر قرار داده و اسپرم‌زایی را مختل کند (Tavalaee et al., 2018). یکی از مهم‌ترین عملکردهای کیسه بیضه نگه داشتن بیضه‌ها در دمای ۱/۵ تا ۲ درجه سانتی‌گراد کمتر از دمای طبیعی بدن است (Ivell, 2007). اختلال در اسپرم‌زایی ممکن است در موج اول آپوپتوز سلول‌های زایا، ناشی از استرس گرمایی رخ دهد (Zou et al., 2021). افزایش دمای بیضه با اختلال در پارامترهای اسپرم همراه است و اسپرماتوسیت‌هایی که از تقسیم اسپرماتوگونیا منشأ می‌گیرند از آسیب‌پذیرترین سلول‌ها در برابر گرما هستند (Shadmehr et al., 2018). افزایش دمای بیضه می‌تواند مستقیماً بر سلول‌های زایا و اسپرم‌زایی تأثیر بگذارد و به دلیل اختلال در تحرک، زنده ماندن و مورفولوژی اسپرم منجر به ناباروری نسبی یا کامل شود

(Pérez-Crespo et al., 2008). دمای بالای بیضه همچنین می‌تواند با تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) استرس اکسیداتیو را افزایش داده و باروری را مختل کند (Han et al., 2021). کاهش تعداد اسپرماتوسیت‌های اولیه و سطح تستوسترون تولید شده توسط سلول‌های لیدینگ و همچنین سلول‌های لیدینگ بزرگ شده به عنوان جبران کاهش سطح تستوسترون در مردان در معرض استرس گرمایی مشاهده شده است (Modaresi and Emadi, 2018).

پیامد اصلی تولید رادیکال‌های آزاد، پراکسیداسیون ساختارهای لیپیدی غشای سلولی است که منجر به تولید و آزادسازی سیستمیک ایکوزانوئیدهای پیش التهابی، اختلال در نفوذپذیری سلول و در نهایت مرگ سلولی می‌شود ( Carden and Grangerl 2000; Grace and Mathie, 1999; Kalogeris et al., 2012).

آنتی‌اکسیدان‌ها مولکول‌هایی هستند که قادر به مهار اکسیداسیون مولکول‌های دیگر می‌باشند. آنتی‌اکسیدان‌ها سیستم دفاعی بدن در برابر آسیب‌های احتمالی ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن هستند که در طول استرس اکسیداتیو رخ می‌دهند ( Miguel et al., 2010).

اخیراً موجوداتی که در محیط‌های دریایی زندگی می‌کنند به دلیل دارا بودن ترکیبات شیمیایی مختلف جالب و مفید مورد توجه صنعت داروسازی قرار گرفته‌اند ( Tramper et al., 2003). جلبک دریایی و اسفنج‌ها غنی‌ترین منبع ترکیبات فعال زیستی هستند که دارای فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی هستند (Ngo et al., 2012). جلبک‌ها در نوعی از شرایط محیطی رشد می‌کنند که منجر به تولید تعداد زیادی رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. برای مقابله با این، جلبک‌ها

متابولیت‌های ثانویه مختلفی با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی مانند فیکوبیلین‌ها (phycobilins)، پلی‌فنول‌ها (polyphenols)، کاروتنوئیدها (carotenoids) و ویتامین‌ها را تولید می‌کنند (Manivannan et al., 2011).

آستاگزانتین (Astaxanthin) با فرمول شیمیایی  $C_{40}H_{52}O_4$  رنگدانه‌ای از خانواده زانتوفیل‌ها (xanthophyll)، مشتقات اکسیژن‌دار کاروتنوئیدها است که سنتز آن در گیاهان از لیکوپن نشأت می‌گیرد (2006 Higuera-Ciapara et al.,). ریزجلبک سبز *Haematococcus pluvialis* در شرایط تنش محتوای بالایی از آستاگزانتین را انباشته می‌کند (Sarada et al., 2002). علاوه بر این ریزجلبک، آستاگزانتین در ماهی قزل‌آلا، میگو و خرچنگ‌ها نیز یافت می‌شود که به آنها سایه خاصی از رنگ قرمز می‌دهد (Kidd et al., 2011). فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین ۱۰ برابر زآگزانتین (zeaxanthin)، لوتئین (lutein)، کانتاکسانتین (canthaxanthin)، بتا-کاروتن ( $\beta$ -carotene) و ۱۰۰ برابر بیشتر از آلفا-توکوفرول ( $\alpha$ -tocopherol) است (Miki et al., 1991). آستاگزانتین و استرهای آن، ۸۰ درصد فعالیت پراکسیداتیو آنتی‌لیپیدی را در موش نشان دادند (Kamath et al., 2008). آستاگزانتین در لیپیدها محلول است و در بافت‌های حیوانی تجمع می‌یابد و هیچ اثر سمی از آن مشاهده نشده است (Ranga et al., 2013).

در بررسی منابع معتبر علمی، مطالعه‌ای در رابطه با اثرات درمانی آستاگزانتین در آسیب ساختاری و عملکردی بیضه، القاء‌شده توسط استرس گرما در موش‌های صحرایی یافت نشد. بنابراین، مطالعه پیش‌رو برای اولین بار جهت ارزیابی اثرات حفاظتی

آستاگزانتین در آسیب ساختاری و عملکردی بیضه، ایجادشده توسط استرس گرما در موش صحرایی طراحی و اجرا گردید.

### مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی آزمایشگاهی بود که در سال ۱۴۰۳ در دانشکده دامپزشکی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تبریز انجام شد. برای انجام این مطالعه، از تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در بازه سنی ۱۱-۱۰ هفتگی و با وزن  $20 \pm 20$  گرم که از محل تهیه و تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تبریز تهیه شدند، استفاده به عمل آمد. شرایط تغذیه و نگهداری در مورد تمام گروه‌ها یکسان و با چرخه ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی و در دمای محیط  $22 \pm 2$  درجه سلسیوس بود. جیره غذایی برای همه گروه‌ها یکسان و دسترسی به آب نوشیدنی نیز آزاد بود. فرصت یک هفته‌ای جهت عادت به محیط و شرایط جدید داده شد و پس از آن آزمایش شروع گردید. موش‌ها به‌طور تصادفی در ۴ گروه برابر شامل: ۱- گروه شاهد ۲- گروه استرس گرما، ۳- گروه استرس گرما به‌علاوه تیمار با دز پایین آستاگزانتین ۴- گروه استرس گرما به‌علاوه تیمار با دز بالای آستاگزانتین توزیع شدند. در این مطالعه کلیه ملاحظات اخلاقی کار روی حیوانات آزمایشگاهی، مصوب کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی، مد نظر قرار گرفت (Anonymous, 2004).

در این مطالعه، تیمار با آستاگزانتین به مدت ۸ هفته طول کشید. از زمان شروع، برای تمامی گروه‌ها از

جیره پایه استاندارد استفاده شد. در گروه‌های تیمار با دز پایین و دز بالای دارو، آستاگزانتین که یک ترکیب محلول در چربی است (Kurihara *et al.*, 2002)، روزانه به ترتیب به میزان ۰/۵ mg/kg/day و ۱ mg/kg/day در ۰/۲ ml روغن زیتون از طریق خوراکی گاوآژ شد. در گروه‌های شاهد و استرس گرما نیز روغن زیتون فاقد آستاگزانتین گاوآژ گردید (Dokumacioglu *et al.*, 2018). پس از ۱ هفته، موش‌های تمام گروه‌ها با تزریق داخل صفاقی کتامین (۹۰ mg/kg) (Alfasan, Holand) و داروی زایلازین (۱۰ mg/kg) (Alfasan, Holand) بی‌هوش شدند (Sancaktutar *et al.*, 2014). کیسه بیضه موش‌های تحت استرس گرما به مدت ۲۰ دقیقه داخل حمام آب ۴۲ درجه سلسیوس قرار گرفت. در گروه شاهد همین عمل با دمای حمام آب ۲۳ درجه سلسیوس انجام شد (Abshenas *et al.*, 2011). تیمار حیوانات تا ۷ هفته دیگر ادامه یافت. در پایان، همه موش‌ها با ایجاد جابه‌جایی در مهره‌های گردن به آسانی کشته شدند. جهت اندازه‌گیری میزان تستوسترون در خون، ۲ میلی‌لیتر از شبکه پشت کره چشم (retro-orbital plexus) خون‌گیری انجام شده و از نمونه خون اخذ شده با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس سرم آن جدا شد. سطح تستوسترون سرم با روش رادیوایمنواسی (radioimmunoassay, RIA) و با استفاده از کیت RIA (Immunotech, Marseille, France) اندازه‌گیری شد.

برای تعیین وضعیت آنتی‌اکسیدانی، قسمتی از بافت بیضه طرف چپ حیوانات به سرعت جدا و در

سالیین خیلی سرد شستشو داده شده و هموژنات ۱۰٪ در ۱/۱۵ (w/v) کلرور پتاسیم تهیه شد. هموژنات حاصله با ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شده و در آخر محلول فوقانی جهت اندازه‌گیری میزان فعالیت آنتی-اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت. OSI که به عنوان شاخص درجه استرس اکسیداتیو (oxidative stress index) در نظر گرفته می‌شود، به شکل نسبت مقادیر وضعیت اکسیدان کل (total oxidant status; TOS) به سطوح وضعیت آنتی‌اکسیدانی کل (total antioxidant status; TAS) تعیین می‌شود (Gunes *et al.*, 2017).

$$OSI \text{ (arbitrary unit)} = \frac{TOS(\mu\text{mol hydrogen peroxide equivalent/L})}{TAS(\mu\text{mol trolox equivalent/L})} \times 100$$

برای تعیین OSI (oxidative stress index)

بیضه، وضعیت اکسیدان کل (total oxidant status; TOS) و وضعیت آنتی‌اکسیدانی کل (total antioxidant status; TAS) در هموژنات بافت بیضه سمت چپ تعیین گردید. مقادیر TOS طبق روشی که توسط ارل در سال ۲۰۰۵ توصیف شده است، تعیین گردید. شدت رنگ، که می‌تواند به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شود، به مقدار کل مولکول‌های اکسیدان موجود در نمونه مربوط می‌شود. سنجش با پراکسید هیدروژن (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) کالیبره شده و نتایج به شکل  $\mu\text{mol hydrogen peroxide equivalent/L}$  ارائه می‌شود (Erel, 2005). مقادیر TAS نیز مطابق با روش ارائه‌شده توسط ارل در سال ۲۰۰۴ برآورد شد. در این روش، اثر آنتی‌اکسیدانی نمونه در برابر واکنش‌های رادیکال آزاد قوی که توسط

با بزرگنمایی  $\times 40$  به وسیله میکروسکوپ نوری مدل نیکون (Nikon, ECLIPSE E200, Japan) انجام شد. برای ارزیابی فعالیت اسپرماتیک (Spermatogenic activity) در مجاری اسپرم‌ساز نمونه‌های بیضه، از روش امتیازدهی اسپرماتوژنز جانسن (Johnsen)، که مبتنی بر این مفهوم است که آسیب بیضه باعث ناپدید شدن متوالی بالغ‌ترین نوع سلول زاینده می‌شود، طبق جدول ۱ نیز استفاده شد (Johnsen *et al.*, 1970). تمام مقاطع توسط میکروسکوپ نوری مدل نیکون (Nikon, ECLIPSE E200, Japan) تحت بررسی قرار گرفتند و فتومیکروگراف‌هایی با بزرگنمایی  $\times 400$  توسط دوربین دیجیتال (Nikon Coolscan 9000 Ed) با وضوح ۱۰ مگاپیکسل از بخش‌های مختلف بافت بیضه تهیه گردید. برای ارزیابی تغییرات هیستوپاتولوژیک از سیستم درجه‌بندی Cosentino طبق جدول ۲ استفاده شد (Cosentino *et al.*, 1985).

رادیکال هیدروکسیل تولیدشده آغاز می‌گردد، اندازه-گیری می‌شود و نتایج به صورت  $\text{mmoL trolox equivalent/L}$  ارائه می‌شود (Erel, 2004).

وضعیت اکسیدانی کل (TOS) و آنتی‌اکسیدانی کل (TAS) با استفاده از کیت‌های تجاری در دسترس (Biotechnology Co., Wuhan, China Elabscience) و طبق دستورالعمل کیت انجام شد.

برای انجام آسیب‌شناسی بافتی، نمونه‌های بافتی از بیضه راست موش‌ها تهیه و در فرمالین بافر ۱۰ درصد پایدار شدند. از نمونه‌های فوق با استفاده از شیوه‌های معمول پاساژ بافت و تهیه مقاطع هیستولوژی، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون و با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین تهیه شد. در این مرحله، وضعیت اسپرماتوژنز و آسیب‌شناسی بافتی بیضه موش‌ها در گروه‌های تحت مطالعه توسط عدسی

جدول ۱- سیستم امتیازدهی جانسن (Johnsen)

| نمره | ویژگی‌های میکروسکوپی   |
|------|--|
| ۱    | هیچ سلول زاینده و سلول سرتولی وجود ندارد.                          |
| ۲    | هیچ سلول زایا وجود ندارد، اما فقط سلول‌های سرتولی وجود دارد.       |
| ۳    | فقط اسپرماتوگونی وجود دارد.  |
| ۴    | فقط تعداد کمی اسپرماتوسیت وجود دارد.                               |
| ۵    | بدون اسپرم یا اسپرماتید، اما تعداد زیادی اسپرماتوسیت وجود دارد.    |
| ۶    | فقط چند اسپرماتید وجود دارد.                                       |
| ۷    | بدون اسپرم، اما تعداد زیادی اسپرماتید وجود دارد.                   |
| ۸    | فقط چند اسپرم وجود دارد.   |
| ۹    | تعداد زیادی اسپرم وجود دارد، اما اپیتلیوم ژرمینال به هم ریخته است. |
| ۱۰   | اسپرم‌زایی کامل بوده و توبول‌های سازمان‌یافته طبیعی وجود دارد.     |

جدول ۲- سیستم امتیازدهی کازنتینو (Cosentino)

| درجه | ویژگی‌های میکروسکوپی   |
|------|--|
| ۱    | ساختار طبیعی بیضه با آرایش منظم سلول‌های ژرمینال و بدون خونریزی و نکروز  |
| ۲    | سلول‌های ژرمینال کمتر منظم و غیر منسجم و لوله‌های اسپرم‌ساز نزدیک به هم با خونریزی و نکروز خفیف  |
| ۳    | سلول‌های ژرمینال نامنظم و تخریب‌شده با هسته‌های چروکیده پیکنوتیک و لوله‌های منی‌ساز با مرزهای کمتر متمایز همراه با خونریزی و نکروز متوسط |
| ۴    | لوله‌های منی‌ساز نزدیک‌به‌هم با نکروز انعقادی سلول‌های ژرمینال همراه با خونریزی و نکروز شدید   |

آسیب‌دیده با استرس گرما افزایش معنی‌داری

( $p < 0/01$ ) در سطوح بیضه‌ای TOS (تا ۱۱۹/۳۵

درصد) و OSI (تا ۴/۲ برابر) و کاهش قابل توجهی در

سطح TAS بیضه (تا ۴۷/۱۴ درصد) در مقایسه با

موش‌های گروه شاهد مشاهده شد. در گروه‌های تیمار

با دزهای پایین (۰/۵ mg/kg/day) و بالای آستاگزانتین

(۱ mg/kg/day) کاهش معنی‌داری ( $p < 0/01$ ) در

سطوح TOS (به ترتیب تا درصد ۲۲/۸۶ و ۴۷/۶۹

درصد) و OSI بیضه‌ای (به ترتیب تا ۴۵/۳۸ درصد و

۷۱/۷۰ درصد) و افزایش معنی‌دار ( $p < 0/01$ ) سطح

TAS بیضه‌ای (به ترتیب تا ۴۰/۵۴ درصد و ۸۳/۷۸

درصد) در مقایسه با گروه آسیب‌دیده با استرس گرما

مشهود بود. به هر حال، تیمار با دز بالای آستاگزانتین

سطوح TOS و TAS و مقدار OSI را به مقادیر متناظر

آنها در گروه شاهد نزدیک کرد و از لحاظ این

پارامترها تفاوت معنی‌داری بین این گروه با گروه

شاهد برآورد نگردید. بین دو گروه تیمار با دز پایین و

دز بالای آستاگزانتین از لحاظ فراسنجه‌های فوق

(TOS، TAS و OSI) تفاوت معنی‌داری ( $p < 0/05$ )

برقرار بود.

نتایج حاصل از بررسی میزان هورمون

تستوسترون خون در گروه‌های مورد مطالعه، در جدول

۴ ارائه گردیده است. در گروه تحت تأثیر استرس گرما

#### - تحلیل آماری داده‌ها:

داده‌های کمی به دست آمده به صورت میانگین  $\pm$  انحراف

معیار ( $mean \pm SD$ ) ارائه شدند. جهت تحلیل آماری

داده‌ها از بسته نرم‌افزاری SPSS ویرایش ۲۵ استفاده

شد. برای بررسی اختلافات بین گروه‌های مورد مطالعه

از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (one-way

ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) استفاده

به عمل آمد. داده‌های مربوط به آسیب‌شناسی بافتی نیز

توسط آزمون غیرپارامتری کروسکال والیس (the

Kruskal wallis test) و پس‌آزمون یو-من-وایتنی

(mann whitney U test) مورد تحلیل قرار گرفت.

مقادیر  $p < 0/05$  معنی‌دار تلقی شدند. از آزمون آماری

کلموگروف-اسمیرنوف (Kolmogrov-Smirnov) که

یکی از آزمون‌های نیکویی برازش است، نیز برای

تعیین نرمال بودن توزیع پراکندگی داده‌ها استفاده شد.

#### یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی میزان فعالیت

آنتی‌اکسیدانی بافت بیضه شامل وضعیت اکسیدانی کل

(TOS)، وضعیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAS) و شاخص

استرس اکسیداتیو (OSI) و مقایسه آنها بین گروه‌های

مورد مطالعه در جدول ۳ ارائه گردیده است. در گروه

میزان هورمون تستوسترون به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش نشان داد ( $p < 0/01$ ). در گروه‌های تیمار با دزهای پایین ( $0/5 \text{ mg/kg/day}$ ) و بالای آستاگزانتین ( $1 \text{ mg/kg/day}$ )، میزان هورمون تستوسترون به‌طور معنی‌داری ( $p < 0/01$ ) نسبت به گروه آسیب‌دیده با استرس گرما افزایش نشان داد. بین گروه‌های تیمار با دزهای پایین و بالای آستاگزانتین اختلاف معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) از لحاظ میزان هورمون تستوسترون برقرار بود. تفاوت معنی‌داری از لحاظ میزان هورمون مذکور بین گروه تیمار با دز بالای آستاگزانتین و گروه شاهد سالم مشاهده نگردید، لکن بین گروه تیمار با دز پایین آستاگزانتین و گروه شاهد سالم تفاوت معنی‌داری ( $p < 0/01$ ) وجود داشت.

بر اساس سیستم امتیازدهی جانسن (Johnson)، فعالیت اسپرماتیک طبیعی مجاری اسپرم‌ساز در گروه شاهد مشاهده شد (میانگین امتیاز:  $9/75$ ، دامنه:  $10-9/5$ ). در گروه تحت تاثیر استرس گرما آسیب‌های بافتی شدید مشاهده شد (میانگین درجه:  $2/75$ ، دامنه:  $5-1/4$ ). آسیب‌های بافتی متوسط و خفیف به ترتیب در گروه تیمار با دز پایین (میانگین درجه:  $5/6$ ، دامنه:  $5-4/7$ ) و در بالای آستاگزانتین (میانگین درجه:  $8/35$ ، دامنه:  $9/5-7/5$ ) مشاهده شد (نمودار ۱).

مقایسه شدت آسیب بافت بیضه بین گروه‌های مورد مطالعه به روش کازنتینو (Cosentino) در نمودار ۲ آورده شده است. بر اساس درجه‌بندی آسیب بافت بیضه به‌روش مذکور، در گروه استرس گرما در مقایسه با گروه شاهد آسیب بافتی معنی‌داری در بیضه موش‌ها ایجاد شد ( $p < 0/01$ ). در گروه تیمار با دز پایین آستاگزانتین، میزان شدت آسیب بافت بیضه به‌طور

معنی‌داری نسبت به گروه آسیب‌دیده با استرس گرما کاهش نشان داد ( $p < 0/05$ ) و در گروه تیمار با دز بالای آستاگزانتین، میزان شدت آسیب در بافت بیضه به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه استرس گرما کاهش بیشتری (نسبت به گروه قبل) نشان داد ( $p < 0/01$ ).

در مشاهدات هیستوپاتولوژی، بافت بیضه موش‌های گروه شاهد دارای ساختاری طبیعی با آرایش منظم سلول‌های زایا بود (شکل ۱).

بافت بیضه موش‌های صحرایی در گروه آسیب‌دیده با استرس گرما تغییرات شدید دژنراتیو و نکروز در سلول‌های زایا و توقف اسپرماتوژنز، کاهش لایه‌های اپیتلیوم ژرمینال، نابسامانی و بی‌نظمی در اپیتلیوم پوشاننده توبول‌ها، تغییر ضخامت و ایجاد بی‌نظمی در لایه بازال توبول‌ها، بی‌نظمی، چروکیدگی و از هم‌گسیختگی ساختار توبولی و نامشخص بودن مرزهای توبولی را در بسیاری از مجاری اسپرم‌ساز نشان داد. همچنین ادم، پرخونی و خونریزی شدیدی در فضای بینابینی توبول‌ها قابل مشاهده بود (شکل ۱).

در گروه استرس گرما بعلاوه تیمار با دز پایین آستاگزانتین، از شدت تغییرات پاتولوژیک در مقایسه با گروه آسیب‌دیده با استرس گرما کاسته شده بود و تغییرات دژنراتیو و نکروز در سلول‌های زایا در حد متوسط مشاهده شد. از شدت کاهش لایه‌ها در اپیتلیوم ژرمینال، بی‌نظمی در اپیتلیوم توبول‌ها، تغییر ضخامت و ایجاد بی‌نظمی در لایه‌های بازال توبولی نیز به‌طور قابل توجهی کاسته شده بود و بی‌نظمی و چروکیدگی در ساختار توبول‌ها در حد متوسطی قابل مشاهده بود.

اتساع فضای میان‌بافتی همراه با ادم و پرخونی به‌طور متوسط مشخص بود (شکل ۱). در گروه استرس گرما بعلاوه تیمار با دز بالای آستاگزانتین بهبود قابل توجهی در آسیب‌های مذکور مشاهده شد و آسیب بافتی بیضه‌ها تا حد خفیف تا ملایمی کاهش یافته بود و در برخی موارد به حالت طبیعی خود نزدیک بود. بدین ترتیب، تغییرات دژنراتیو خفیف و ملایمی در اپیتلیوم مجاری اسپرم‌ساز دیده می‌شد و اتساع جزئی در فضای میان‌بافتی با پرخونی ملایم نیز در برخی مناطق قابل مشاهده بود (شکل ۱).

جدول ۳- مقایسه شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی بافت بیضه موش‌های صحرایی بین گروه‌های مورد مطالعه (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

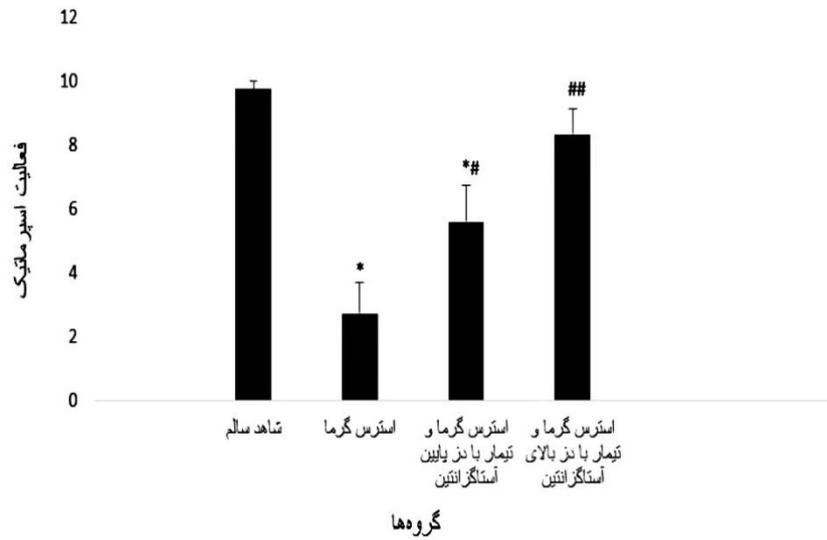
| گروه‌ها   |   | شاخص‌ها           | شاهد             | استرس گرما  |
|---|---|-------------------|------------------|---|
| استرس گرما بعلاوه تیمار با دز بالای آستاگزانتین | استرس گرما بعلاوه تیمار با دز پایین آستاگزانتین | استرس گرما        | شاهد             | استرس گرما  |
| ۱۹/۱۵ $\pm$ ۱/۶۳ <sup>#</sup>                   | ۲۸/۲۴ $\pm$ ۲/۷۹ <sup>##</sup>                  | ۳۶/۶۱ $\pm$ ۳/۱۴* | ۱۶/۶۹ $\pm$ ۱/۱۷ | وضعیت اکسیدانی کل ( $\mu\text{mol}$ hydrogen peroxide equivalent/L) |
| ۱/۳۶ $\pm$ ۰/۱۷ <sup>#</sup>                    | ۱/۰۴ $\pm$ ۰/۱۲ <sup>##</sup>                   | ۰/۷۴ $\pm$ ۰/۰۹*  | ۱/۴۰ $\pm$ ۰/۱۸  | وضعیت آنتی‌اکسیدانی کل ( $\text{mmol}$ trolox equivalent/L)         |
| ۱/۴۴ $\pm$ ۰/۳۱ <sup>#</sup>                    | ۲/۷۸ $\pm$ ۰/۶۱ <sup>##</sup>                   | ۵/۰۹ $\pm$ ۱/۱۰*  | ۱/۲۲ $\pm$ ۰/۲۴  | شاخص درجه استرس اکسیداتیو (AU)                                      |

\* ( $p < 0/01$ ) اختلاف از گروه شاهد سالم را نشان می‌دهد و # ( $p < 0/01$ ) اختلاف از گروه آسیب‌دیده با استرس گرما را نشان می‌دهد.  $\text{##}$  ( $p < 0/05$ ) اختلاف بین دو گروه تیمار شده با آستاگزانتین ( $n = 10$ ).

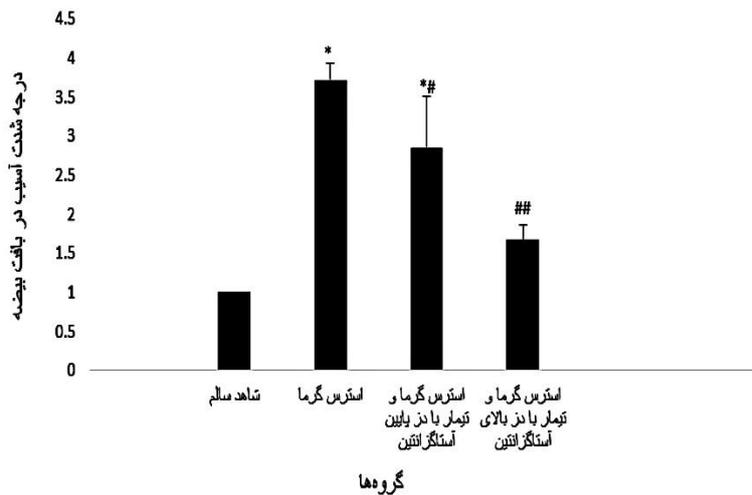
جدول ۴- مقایسه میزان هورمون تستوسترون خون موش‌های صحرایی بین گروه‌های مورد مطالعه (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

| گروه‌ها   | تستوسترون (ng/mL)             |
|---|-------------------------------|
| شاهد  | ۲/۰ $\pm$ ۵۸/۵۷               |
| استرس گرما                                      | ۰/۰ $\pm$ ۹۱/۲۴*              |
| استرس گرما بعلاوه تیمار با دز پایین آستاگزانتین | ۱/۰ $\pm$ ۶۶/۴۹ <sup>##</sup> |
| استرس گرما بعلاوه تیمار با دز بالای آستاگزانتین | ۲/۰ $\pm$ ۳۲/۶۰ <sup>#</sup>  |

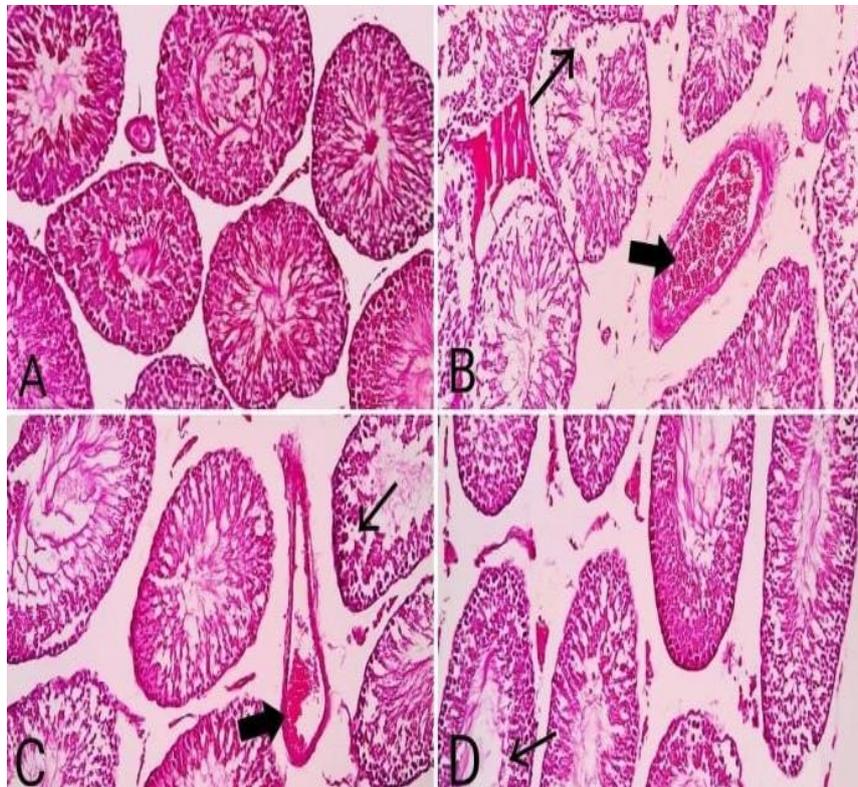
\* ( $p < 0/01$ ) اختلاف از گروه شاهد سالم را نشان می‌دهد و # ( $p < 0/01$ ) اختلاف از گروه آسیب‌دیده با استرس گرما را نشان می‌دهد.  $\text{##}$  ( $p < 0/05$ ) اختلاف بین دو گروه تیمار شده با آستاگزانتین ( $n = 10$ ).



نمودار ۱- مقایسه فعالیت اسپرماتیک مجاری اسپرم‌ساز بافت بیضه بین گروه‌های مورد مطالعه به روش جانسن (Johnson). \* ( $p < 0.05$ ) اختلاف از گروه شاهد سالم را نشان می‌دهد و # ( $p < 0.05$ ) و ## ( $p < 0.01$ ) اختلاف از گروه آسیب‌دیده با استرس گرما را نشان می‌دهد (n=10).



نمودار ۲- مقایسه شدت آسیب بافت بیضه بین گروه‌های مورد مطالعه به روش کازنتینو (Cosentino). \* ( $p < 0.05$ ) اختلاف از گروه شاهد سالم را نشان می‌دهد و # ( $p < 0.05$ ) و ## ( $p < 0.01$ ) اختلاف از گروه آسیب‌دیده با استرس گرما را نشان می‌دهد (n=10).



شکل ۱- نمای ریزی بینی از بافت بیضه موش صحرائی از چهار گروه متفاوت. شکل A- نمای ریزی بینی از بافت بیضه یک موش صحرائی از گروه شاهد سالم. ساختار بافتی بیضه طبیعی بوده و تغییر پاتولوژیک قابل ملاحظه‌ای در آن مشاهده نمی‌شود. شکل B- نمای ریزی بینی از بافت بیضه یک موش صحرائی از گروه آسیب‌دیده توسط استرس گرما. تغییرات شدید دژنراتیو و نکروز در سلول‌های زایا و توقف اسپرماتوزن، کاهش لایه‌های اپیتلیوم ژرمینال، بی‌نظمی در اپیتلیوم پوشاننده توبول‌ها، تغییر ضخامت و ایجاد بی‌نظمی در لایه بازال توبول‌ها، بی‌نظمی، چروکیدگی و از هم‌گسیختگی ساختار توبولی در مجاری اسپرم‌ساز دیده می‌شود (فلش باریک). ادم و پرخونی شدید در فضای بینابینی توبول‌ها قابل مشاهده است (فلش ضخیم). شکل C- نمای ریزی بینی از بافت بیضه یک موش صحرائی از گروه تیمار با دز پایین آستاگزانتین. تغییرات دژنراتیو و نکروز در سلول‌های زایا در حد متوسط مشاهده می‌شود (فلش باریک). از شدت کاهش لایه‌ها در اپیتلیوم ژرمینال، بی‌نظمی در اپیتلیوم توبول‌ها، تغییر ضخامت و ایجاد بی‌نظمی در لایه‌های بازال توبولی نیز به‌طور قابل توجهی کاسته شده است. بی‌نظمی و چروکیدگی در ساختار توبول‌ها همچنان قابل مشاهده است ولی از شدت آنها به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاسته شده است. اتساع فضای میان‌بافتی همراه با ادم و پرخونی ملایم قابل مشاهده می‌باشد (فلش ضخیم). خونریزی نیز مشاهده نمی‌شود. شکل D- نمای ریزی بینی از بافت بیضه یک موش صحرائی از گروه تیمار با دز بالای آستاگزانتین. تغییرات دژنراتیو ملایم و خفیفی در اپیتلیوم مجاری اسپرم‌ساز دیده می‌شود (فلش باریک). اتساع جزئی در فضای میان‌بافتی با پرخونی خفیف در برخی مناطق قابل مشاهده است (هماتوکسیلین-ئوزین، درشت‌نمایی  $\times 400$ ).

## بحث و نتیجه‌گیری

تمام نتایج تحقیقات بیوشیمیایی، مورفولوژیک و هیستوپاتولوژیک مطالعه حاضر نشان می‌دهد که آستاگزانتین اثر مطلوبی در آسیب استرس حرارتی

بافت بیضه در موش‌های صحرائی دارد. طبق یافته‌های این مطالعه، متغیرهای اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی و نمره جانسن در گروه‌های تیمار با آستاگزانتین به صورت

وابسته به دز نسبت به گروه تحت استرس حرارتی وضعیت بهتری دارد.

در بررسی حاضر متعاقب تنش حرارتی در بافت بیضه، میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام کاهش و در مقابل آن ظرفیت اکسیدانی تام و شاخص استرس اکسیداتیو افزایش نشان داد. مطالعات قبلی نیز نشان داده‌اند که افزایش دمای بیضه با افزایش سطح استرس اکسیداتیو در ارتباط است (Rao *et al.*, 2015). استرس اکسیداتیو باعث آسیب به غشای پلاسمایی اسپرم و تخریب رشته DNA هسته‌ای و میتوکندریایی می‌شود (Hjollund *et al.*, 2002). علاوه بر اینکه استرس اکسیداتیو در آسیب اسپرماتوژنز شرکت می‌کند، فرار گرفتن در معرض حرارت متقاطع نسبت به حرارت متوالی می‌تواند به صورت جدی‌تر به فرآیند اسپرماتوژنز آسیب برساند (Rao *et al.*, 2015). نتایج مطالعات برکت و همکاران، نشان داد که افزایش دمای بیضه و استرس اکسیداتیو، روند اسپرماتوژنز و میزان باروری را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Barekat *et al.*, 2016). گونه‌های فعال اکسیژن (reactive oxygen species; ROS) مانند آنیون سوپر اکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و رادیکال هیپوکلریت، در طول متابولیسم اکسیژن تولید شده و در بیضه یافت می‌شوند (Agarwal *et al.*, 2012). برای حفظ ROS در سطح قابل قبول، آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، مانند ویتامین C و E و کاروتنوئید در بیضه موجود می‌باشد. هنگامی که تعادل رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدان‌ها از بین رود، استرس اکسیداتیو رخ داده و در نهایت منجر به آپوپتوز می‌شود (Paul *et al.*, 2009).

گونه‌های فعال اکسیژن در بیضه افراد مبتلا به کریپتورکیدیسم و واریکوسل تولید می‌شود و دو راه احتمالی که آن‌ها می‌توانند در پاسخ به استرس گرمایی درگیر شوند شامل: اول، اکسیداسیون اجزای سلولی مانند DNA و چربی است که می‌تواند به طور مستقیم منجر به آپوپتوز شده و دوم، تولید ROS به طور غیرمستقیم است که می‌تواند باعث فعال شدن آپوپتوز شود (Shiraishi *et al.*, 2010). بنابراین استرس اکسیداتیو عامل مهمی در اتیولوژی ناباروری مردان است. حمله ROS می‌تواند باعث القای لیپید پراکسیداسیون در غشای اسپرم جداشده از مایع منی و قطعه قطعه شدن DNA، اختلال در تحرک این سلول‌ها شود. استرس اکسیداتیو در بیضه قادر به اختلال در ظرفیت استروئیدوژنیک سلول‌های لیدینگ و همچنین ظرفیت اپیتلیوم زایا جهت افتراق اسپرم طبیعی است (Bromfield *et al.*, 2015).

از آنجایی که استرس اکسیداتیو عامل اصلی آسیب پس از استرس حرارتی بیضه است، در برخی از مدل‌های حیوانی، آنتی‌اکسیدان‌ها برای جلوگیری از آپوپتوز سلول‌های زاینده و کاهش آسیب اسپرم تجویز می‌شود (Moreno *et al.*, 2012).

مطالعه ما اولین مطالعه‌ای است که اثر بالقوه مطلوب آستاگزانتین را بر آسیب استرس حرارتی بیضه در یک مدل حیوانی بررسی می‌کند. اوتسوکا و همکاران طی مطالعه‌ای نتیجه گرفتند که آستاگزانتین از آسیب ناشی از ایسکمی شبکیه جلوگیری می‌کند و استفاده از آن می‌تواند در محافظت در برابر تخریب عصبی در طول رتینوپاتی ایسکمیک موثر باشد (Otsuka *et al.*, 2016). اثر آستاگزانتین همچنین در

عمدتاً در مراحل اولیه و اواخر وجود دارد. اسپرمتوسیت‌های پاکین، اسپرمتوسیت‌های دیپلوتن و اسپرمتوسیت‌های اولیه انواع سلولی هستند که اغلب تحت تأثیر قرار می‌گیرند (Lue *et al.*, 1999). این افزایش آپوپتوز سلول‌های زاینده، اندازه بیضه را کاهش می‌دهد (Jannes *et al.*, 1998). در مطالعات اخیر، BCL-2 در گاوهای نر (Rizzoto *et al.*, 2020) ۲۴ ساعت پس از قرار گرفتن در معرض حرارت تا ۳۰ درصد کاهش یافت که منجر به ایجاد یک شرایط مولکولی می‌شود که آپوپتوز را القاء می‌کند. کاسپاز-۹ و کاسپاز-۳، دو مشخصه آپوپتوز، پس از استرس حرارتی در سلول‌های زایای موش فعال می‌شوند، در حالی که مهار دارویی آنها از مرگ سلول‌های زاینده جلوگیری می‌کند و کاسپازها را در مرگ سلول‌های زایا ناشی از شوک حرارتی دلالت می‌دهد (Vera *et al.*, 2005). به طور مشابه، در یک مدل موش، در ۱۴ روز پس از قرار گرفتن در معرض گرما، ۴ برابر افزایش در Casp 8 (آغازکننده)، به علاوه کاهش معنی‌دار در وزن بیضه‌ها و قطر لوله‌های منی ساز وجود داشت (Shahat *et al.*, 2020)، که به آن نسبت داده شده است (Kastelic *et al.*, 2019). یکی از عوامل اصلی درگیر در این مسیر، ژن عامل شوک حرارتی ۱ (HSF1) و محصول آن، پروتئین HSF1 است. دومین عامل، توسعه پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) را تنظیم می‌کند که پس از استرس حرارتی سلول‌ها را محافظت می‌کند (Zhang *et al.*, 2002). پروتئین‌های شوک حرارتی HSP 70 و HSP 90 شایع‌ترین HSPها در بافت‌های مختلف هستند (Zhao *et al.*, 2010). در پاسخ به استرس حرارتی، ژن‌های HSF1 و HSP با

آسیب ایسکمی-بازخونسازی کبد و عضلات با نتایج خوش بینانه به نفع یک اثر مطلوب مورد بررسی قرار گرفت (Curek *et al.*, 2010; Zuluaga Tamayo *et al.*, 2019). آسیب ایسکمی-بازخونسازی میوکارد توسط تیمی از محققان به رهبری لاور بررسی شد. آنها به این نتیجه رسیدند که دی سدیم دی سوکسینات آستاگزانتین اثر مفیدی بر کاهش آسیب دارد (Lauver *et al.*, 2005). نشان داده شده است که آستاگزانتین در حفظ عملکرد کلیه و بافت شناسی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مدل کلیه موش موثر است (Tripathi and Jena, 2008; Qiu *et al.*, 2015). آستاگزانتین را به عنوان یک محافظ سلول‌های زایا، در موش‌های تحت درمان با سیکلوفسفامید مطرح می‌کنند. اثر مثبت آستاگزانتین بر استروئیدزایی در سلول‌های لیدینگ توسط وانگ و همکارانش توضیح داده شد (Wang *et al.*, 2015). در تحقیقاتی که در خصوص آسیب ایسکمی-بازخونسازی بیضه انجام شده، نشان داده شده است که افزایش دمای بیضه، به هر دلیل، همه انواع سلول‌های بیضه را تحت تأثیر قرار می‌دهد، اگرچه سلول‌های زاینده نسبت به سلول‌های سرتولی یا لیدینگ حساس‌تر هستند (Waites and Setchell, 1990). اسپرمتوسیت‌های پاکین، اسپرمتیدها و اسپرم‌های اپیدیدیم حساس‌ترین سلول‌های زایای حرارتی هستند (Setchell, 1998). پیامد اصلی استرس حرارتی بر روی بیضه، تخریب سلول‌های زاینده توسط مکانیسمی تحت عنوان آپوپتوز است (Kim *et al.*, 2013). نشان داده شده است که ۱ یا ۲ روز پس از غوطه‌ور شدن بیضه‌های موش در آب ۴۲ درجه سلسیوس (استرس حرارتی)، آپوپتوز سلول‌های زاینده،

جفت نشده و بسیار ناپایدار هستند که آنها را علیه لیپیدها، اسیدهای آمینه و اسیدهای نوکلئیک بسیار واکنش‌گر می‌کند (Franco *et al.*, 2008). استرس گرمایی باعث افزایش تنظیم هم‌اکسیژناز ۱ (HMOX1) و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، یعنی گلوکوتایون پراکسیداز ۱ (GPX1)، گلوکوتایون-اس ترانسفراز آلفا (GST- $\alpha$ ) و سوپراکسید دیسموتاز ۱ (SOD1) می‌شود که نشان دهنده پاسخ استرس اکسیداتیو قوی است. علاوه بر این، با استفاده از GPX1 به عنوان نماینده پاسخ آنتی‌اکسیدانی تحت استرس گرمایی، موش‌هایی که به مدت ۲۰ دقیقه در معرض دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند، ۱۲ ساعت پس از قرار گرفتن در معرض حرارت ژن mRNA GPX1 تقریباً ۱۷/۵ برابر افزایش یافت که نشان‌دهنده پاسخ سریع و شدید است (Shahat *et al.*, 2020).

در خصوص کاهش میزان تستوسترون خون متعاقب استرس حرارتی بیضه‌ها، مطالعات نشان داده است که عدم تعادل هورمونی، از جمله کاهش بیان ژن و پروتئین StAR (پروتئین تنظیم‌کننده حاد استروئیدوژن)، اغلب در پاسخ به استرس حرارتی رخ می‌دهد (Bozkaya *et al.*, 2017). کاهش فعالیت این آنزیم که یک مرحله ضروری در استروئیدوژنز است، باعث کاهش غلظت خونی تستوسترون، یک هورمون استروئیدی با نقش حیاتی در ترویج اسپرماتوژنز و حفظ یکپارچگی بیضه می‌شود (Mete *et al.*, 2012). کاهش بیان ژن Star و غلظت تستوسترون بیضه (کاهش ۱۰ برابری برای هر کدام) پس از ۴۸ ساعت استرس حرارتی بیضه در گاوها وجود داشت که نشان دهنده شدت تأثیر استرس حرارتی بر استروئیدزایی و

افزایش بیان محصولات پروتئینی آنها، با هدف جلوگیری از دناتوره شدن پروتئین و در نتیجه کاهش اثرات مضر استرس حرارتی، افزایش می‌یابند (Zhang *et al.*, 2002). برای تشخیص فعال‌سازی سریع سیستم چاپرون، در بیضه‌های گاوه‌های نر ۱۲ ساعت پس از استرس حرارتی افزایش زیادی (تقریباً ۴۰ برابر) در بیان HSP 70 وجود داشت (Rizzoto *et al.*, 2020). ژن p53 (سرکوبگر تومور) یک القاء‌کننده بالقوه آپوپتوز سلول زایا است. فعالیت p53 در بیضه‌ها پس از استرس حرارتی افزایش می‌یابد و با از دست دادن سلول‌های زایا مرتبط است (Absalan *et al.*, 2010). به دنبال القای کریپتورکیدیسم در موش‌های فاقد p53، مرگ سلول‌های زایای نر به تعویق افتاد، اما همچنان به وقوع پیوست، که نشان می‌دهد القای کریپتورکیدیسم هر دو مسیر وابسته به p53 و مستقل از p53 آپوپتوز سلول زایا را واسطه می‌کند (Yin *et al.*, 1998). مطالعات اخیر دخالت مسیر وابسته به p53 را تایید کرده است که منجر به فعال شدن دو مکانیسم مجزا، یعنی درونی و بیرونی، با فعال شدن عوامل پایین دستی منجر به آپوپتوز می‌شود. در مدل‌های موش، ژن p53 حدود ۱۴ روز پس از قرار گرفتن در معرض گرما، ۸ برابر افزایش پیدا کرد (Shahat *et al.*, 2020). علاوه بر این، Fas (FAS cell surface; CD95/Apo-1) ممکن است مسئول آپوپتوز سلول‌های زایا مستقل از p53 باشد (Yin *et al.*, 2002). علاوه بر دخالت فاکتورهای رونویسی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در شروع آپوپتوز برای آپوپتوز سلول‌های زایا و آسیب DNA از اهمیت بالایی برخوردار است (Makker *et al.*, 2009). ROS مولکول‌هایی با حداقل یک الکترون

در سلول‌های لیدیگ، فاکتور ۱ آلفا (hypoxia-) HMOX1 و (inducible factor 1 alpha: HIF1A) القاء‌کننده هیپوکسی به میزان بالایی بیان می‌شوند، که نشان می‌دهد گرما باعث ایجاد هیپوکسی و استرس اکسیداتیو در این سلول‌ها می‌شود (Paul et al., 2009). علاوه بر این، گرمای بیضه منجر به هیپرپلازی سلول‌های لیدیگ می‌شود که با تحریک فعالیت پروتئین‌های سیکلین و کاهش بیوستز تستوسترون در بیضه‌های موش بالغ انجام می‌شود (Li et al., 2016). بنابراین، گرما ممکن است به طور غیرمستقیم به سلول‌های زایا با تغییر عملکرد سلول‌های سوماتیک آسیب برساند (Kim et al., 2013). مطالعات کمی مسیرهای پاتوفیزیولوژیک مرتبط با تأثیر شوک حرارتی بر عملکرد بیضه و کیفیت اسپرم را بررسی کرده‌اند (Durairajanayagam et al., 2015). با این حال، نتایج بسیار اخیر درک عوامل دخیل در پاسخ بیضه به استرس گرمایی را در گاو (Rizzoto et al., 2020) و موش بهبود بخشیده است (Shahat et al., 2020).

سیستم‌های چاپرون و آنتی‌اکسیدان، مکانیسم‌های دفاعی هستند که بلافاصله پس از قرار گرفتن در معرض شوک حرارتی فعال می‌شوند. تحت دماهای بالا، HSF1 باعث افزایش Hsp 70 و Hsp 90 می‌شود (Rizzoto et al., 2020)، که در ارتباط با چاپرون‌ها برای کاهش فعالیت ژن p53 عمل می‌کنند (Durairajanayagam et al., 2015). با این حال، هنگامی که ژن p53 به دلیل قرار گرفتن در معرض حرارت فعال می‌شود، منجر به فعال شدن دو مسیر آپوپتوز مهم، یعنی مسیرهای آپوپتوز درونی و بیرونی وابسته به p53 می‌شود. در مسیر بیرونی، p53 ارتباط

محیط هورمونی ناشی از آن است (Rizzoto et al., 2020).

کاهش تولید پروتئین متصل‌کننده آندروژن بیضه (androgen binding protein) به دنبال کریپتورکیدیسم تجربی، شاهدهی است مبنی بر اینکه گرما بر سلول‌های سرتولی تأثیر منفی می‌گذارد (Karpe et al., 1981). علاوه بر این، بیان فیلامان‌های حدواسط در سلول‌های سرتولی در میمون‌های کریپتورکیدیسم مختل شد (Zhang et al., 2004).

استرسی حرارتی باعث از بین رفتن تمایز سلول‌های سرتولی بالغ شاید با برهم زدن اتصالات سلولی در اپیتلیوم منی‌ساز و تأثیر چشمگیر بر بیان مولکول‌های مرتبط با اتصال در سلول‌های سرتولی در میمون‌های مسن شد (Zhang et al., 2006). این تغییرات نقش حمایت‌کننده اسپرماتوژنز را مختل می‌کند و ممکن است آپوپتوز سلول زایا را القا کند (Chen et al., 2008). علاوه بر این، قرار گرفتن سلول‌های سرتولی در معرض حرارت ۴۲ درجه سانتیگراد ممکن است بقای آنها را تهدید کند و بیان بیش از حد کانکسین-۴۳ (connexin-43) به دلیل شوک حرارتی ممکن است باعث اختلال در عملکرد سلول‌های سرتولی شود (Hassanpour et al., 2015).

اگرچه در گذشته چنین اظهار می‌شد که سلول‌های لیدیگ تحت تأثیر استرس گرما قرار نمی‌گیرند (Setchell, 2006)، لکن، طبق گزارشات، مورفولوژی سلول لیدیگ در بیضه‌های موش‌های صحرائی که روزانه ۳۰ دقیقه به مدت ۶ روز در معرض گرما قرار داشتند، مختل شد (Aktas and Kanter, 2009). علاوه بر این، شواهدی وجود دارد که

بین FAS و FADD را برای تشکیل کمپلکس گیرنده مرگ تحریک می‌کند که منجر به فعال شدن کاسپازهای آغازگر می‌شود (کاسپازهای ۸ و ۱۰) (Durairajanayagam *et al.*, 2015). علاوه بر این، در مسیر درونی، p53 تعادل BAX و BCL-2 را در میتوکندری مختل می‌کند (Rizzoto *et al.*, 2020)، که منجر به آزاد شدن عواملی (APAF1pCyt C) می‌شود که باعث فعال شدن گروه دیگری از کاسپازهای آغازگر می‌شود (کاسپازهای ۲ و ۹). در نهایت، هر دو گروه کاسپازهای آغازگر (از هر دو مسیر درونی و بیرونی) منجر به فعال شدن کاسپازهای جلا (کاسپازهای ۳، ۶ و ۹) می‌شوند که منجر به مراحل نهایی می‌شوند که آپوپتوز را القا می‌کنند.

با اندازه‌گیری تمام پارامترهای بیوشیمیایی، شاخص‌های اسپرماتوژنز و پاتولوژیک می‌توان نتیجه گرفت که آستاگزانتین در درمان آسیب ناشی از استرس حرارتی بیضه در موش‌های صحرایی اثرات بسیار مطلوبی دارد.

اگرچه این اولین مطالعه‌ای است که به طور جامع اثر آستاگزانتین را به صورت بافت‌شناسی بر آسیب استرس حرارتی بیضه بررسی می‌کند، ما از این واقعیت آگاه هستیم که در تحقیقات آینده باید بر روش‌های بیوشیمیایی و ایمونوهیستوشیمی بیشتری متمرکز شویم، تا نتایج را بیشتر غنی کرده و فرضیه را کاملاً تأیید کنیم. در مطالعات آینده، شاخص‌های آپوپتوز به صورت ایمونوهیستوشیمیایی نیز تعیین خواهند شد.

همچنین ضروری است که در مطالعات آتی بر اثرات هم‌افزایی آستاگزانتین با سایر داروهای موثر، متمرکز شویم. در مطالعات آینده، مطمئناً می‌توان افزایش زمان استرس حرارتی را در نظر گرفت. همچنین، جالب است بدانیم که دوز کاهش یافته آستاگزانتین چه تأثیری خواهد داشت. از مطالعه ما آشکار است که افزایش دوز آستاگزانتین بر اثرات آنتی‌اکسیدانی اعمال شده تأثیر می‌گذارد. مطمئناً بهتر است که بهینه‌ترین دوز مصرف برای تجویز آستاگزانتین را نیز بدانیم. در نهایت پرواضح است که نتایج مطالعه ما را نمی‌توان مستقیماً در کلینیک اعمال کرد، اما مطمئناً پایه خوبی برای تحقیقات آینده در مورد این آنتی‌اکسیدان قوی می‌باشد.

### سپاسگزاری

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه دکتری تخصص آقای طاها باقری می‌باشد. لذا، بدین وسیله نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه به خاطر تامین هزینه اجرای این تحقیق قدردانی می‌نمایند.

### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

## منابع

- Abdollahzadeh Soreshjani, S. and Ashrafizadeh, M. (2018). Effects of exercise on testosterone level, heat shock protein, and fertility potential. *Reviews in Clinical Medicine*, 5(4): 141-145.
- Anonymous (2004). Australian code of practice for the care and use of animals for scientific purposes, 7th ed., <http://www.nhmrc.gov.au/publications/synopses/s/-files/ea16>.
- Abshenas, J., Babaei, H., Zarei, M.H., Allahbakhshi, A. and Sharififar, F. (2011). The effects of green tea (*Camellia sinensis*) extract on mouse semen quality after scrotal heat stress. *Veterinary Research Forum*, 2(4): 242-247.
- Agarwal, A., Hamada, A. and Esteves, S.C. (2012). Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. *Nature Reviews Urology*, 9(12): 678-690.
- Barekat, F., Tavalaei, M., Deemeh, M.R., Bahreinian, M., Azadi, L., Abbasi, H., et al. (2016). A Preliminary Study: N-acetyl L-cysteine Improves Semen Quality following Varicocelectomy. *International Journal of Fertility and Sterility*, 10(1): 120.
- Bromfield, E.G., Aitken, R.J., Anderson, A.L., McLaughlin, E.A. and Nixon, B. (2015). The impact of oxidative stress on chaperone-mediated human sperm-egg interaction. *Human Reproduction*, 30(11): 2597-2613.
- Carden, D.L. and Granger, D.N. (2000). Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury. *Iranian Journal of Pathology*, 190(3): 255-266.
- Cosentino, M.J., Nishida, M., Rabinowitz, R. and Cockett, A.T. (1985). Histological changes occurring in the contralateral testes of prepubertal rats subjected to various durations of unilateral spermatic cord torsion. *The Journal of Urology*, 133(5): 906-911.
- Curek, G.D., Cort, A., Yucel, G., Demir, N., Ozturk, S., Elpek, G.O., et al. (2010). Effect of astaxanthin on hepatocellular injury following ischemia/reperfusion. *Toxicology*, 267(1-3): 147-153.
- Dokumacioglu, E., İskender, H., Yenice, G., Kapakin, K.A., Sevim, C., Hayirli, A., et al. (2018). Effects of astaxanthin on biochemical and histopathological parameters related to oxidative stress on testes of rats on high fructose regime. *Andrologia*, 50(7): 130-142.
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38(12): 1103-1111.
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4): 277-285.
- Gunes, S., Ayhanci, A., Sahinturk, V., Altay, D.U. and Uyar, R. (2017). Carvacrol attenuates cyclophosphamide-induced oxidative stress in rat kidney. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 95(7): 844-849.
- Han, J., Yang, D., Liu, Z., Tian, L., Yan, J., Li, K., et al. (2021). The damage effect of heat stress and psychological stress combined exposure on uterus in female rats. *Life Sciences*, 1:286:120053.
- Higuera-Ciapara, I., Fe'lix-Valenzuela, L. and Goycoolea, F.M. (2006). Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2): 185-196.
- Hjollund, N.H., Storgaard, L., Ernst, E., Bonde, J.P. and Olsen, J. (2002). Impact of diurnal scrotal temperature on semen quality. *Reproductive Toxicology*, 16(3): 215-221.
- Ivell, R. (2007). Lifestyle impact and the biology of the human scrotum. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 5(1): 1-8.
- Johnsen, S.G. (1970). Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormone Research in Paediatrics*, 1(1): 2-25.
- Jannes, P., Spiessens, C., Van der Auwera, I., Hooghe, T.D., Verhoeven, G. and Vanderschueren, D. (1998). Male subfertility induced by acute scrotal heating affects embryo quality in normal female mice. *Human Reproduction*, 13(2): 372-375.

- Kidd, P. (2011). Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential. *Alternative Medicine Review*, 16(4): 355-364.
- Kim, B., Park, K. and Rhee, K. (2013). Heat stress response of male germ cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(15): 2623-2636.
- Kamath, B.S., Srikanta, B.M., Dharmesh, S.M., Sarada, R. and Ravishankar, G.A. (2008). Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *European Journal of Pharmacology*, 590(1-3): 387-395.
- Kurihara, H., Koda, H., Asami, S., Kiso, Y. and Tanaka, T. (2002). Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress. *Life Sciences*, 70(21): 2509-2520.
- Lue, Y.H., Sinha Hikim, A.P., Swerdloff, R.S., Im, P., Taing, K.S., Bui, T., et al. (1999). Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology*, 140(4): 1709-1717.
- Lauer, D.A., Lockwood, S.F. and Lucchesi, B.R. (2005). Disodium Disuccinate Astaxanthin (Cardax) attenuates complement activation and reduces myocardial injury following ischemia/reperfusion. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(2): 686-692.
- Modaresi, M. and Emadi, M. (2018). The effects of rosemary extract on spermatogenesis and sexual hormones of mice under heat stress. *Trends Journal of Sciences Research*, 3(2): 69-74.
- Miguel, M.G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12): 9252-9287.
- Manivannan, K., Karthikai Devi, G., Anantharaman, P. and Balasubramanian, T. (2011). Antimicrobial potential of selected brown seaweeds from Vedalai coastal waters, Gulf of Mannar. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2): 114-120.
- Miki, W. (1991). Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 63(1): 141-146.
- Moreno, R.D., Lagos-Cabre, R., Julio, B., Urzúa, N. and Bustamante-Marín, X. (2012). Molecular basis of heat stress damage in mammalian testis. *The Journal of Biochemistry*, 68(7): 127-155.
- Ngo, D.H., Vo, T.S., Ngo, D.N., Wijesekara, I. and Kim, S.K. (2012). Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(4): 378-383.
- Otsuka, T., Shimazawa, M., Inoue, Y., Nakano, Y., Ojino, K., Izawa, H., et al. (2016). Astaxanthin protects against retinal damage: evidence from in vivo and in vitro retinal ischemia and reperfusion models. *Current Eye Research*, 41(11): 1465-1472.
- Pérez-Crespo, M., Pintado, B. and Gutiérrez-Adán, A. (2008). Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 75(1): 40-47.
- Paul, C., Teng, S. and Saunders, P.T. (2009). A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. *Biology of Reproduction*, 80(5): 913-919.
- Qiu, X., Fu, K., Zhao, X., Zhang, Y., Yuan, Y., Zhang, S., et al. (2015). Protective effects of astaxanthin against ischemia/reperfusion induced renal injury in mice. *Journal of Translation Medicine*, 27(13): 28.
- Ranga Rao, A., Baskaran, V., Sarada, R. and Baskaran, V. (2013). In vivo bioavailability and antioxidant activity of carotenoids from micro algal biomass - a repeated dose study. *Food Research International*, 54(1): 711-717.
- Rao, M., Zhao, X.L., Yang, J., Hu, S.F., Lei, H., Xia, W., et al. (2015). Effect of transient scrotal hyperthermia on sperm parameters, seminal plasma biochemical markers, and oxidative stress in men. *Asian Journal of Andrology*, 17(4): 668-675.

- Shadmehr, S., Tabatabaei, S.R., Hosseinifar, S., Tabandeh, M.R. and Amiri, A. (2018). Attenuation of heat stress-induced spermatogenesis complications by betaine in mice. *Theriogenology*, 15(106): 117-126.
- Sarada, R., Tripathi, U. and Ravishankar, G.A. (2002). Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochemistry*, 37(6): 623-627.
- Sancaktutar, A.A., Bodakci, M.N., Hatipoglu, N.K., Soylemez, H., Basarılı, K. and Turkcü, G. (2014). The protective effects of pomegranate extracts against renal ischemia-reperfusion injury in male rats. *Urology Annals*, 6(1): 46-50.
- Setchell, B.P. (1998). The parkes lecture heat and the testis. *Reproduction*, 114(2): 179-194.
- Shiraishi, K., Takihara, H. and Matsuyama, H. (2010). Elevated scrotal temperature, but not varicocele grade, reflects testicular oxidative stress-mediated apoptosis. *World Journal of Urology*, 28(3): 359-364.
- Tavalae, M., Sadeghi, N. and Nasr-Esfahani, M.H. (2019). Effect of heat stress on Spermatogenesis. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*, 20(5): 110-127. [in Persian]
- Tramper, J., Battershill, C., Brandenburg, W., Burgess, G., Hill, R., Luiten, E., et al. (2003). What to do in marine biotechnology? *Biomolecular Engineering*, 20(4-6): 467-471.
- Tripathi, D.N. and Jena, G.B. (2008). Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells. *Toxicology*, 248(2-3): 96-103.
- Wang, J.Y., Lee, Y.J., Chou, M.C., Chang, R., Chiu, C.H., Liang, Y.J., et al. (2015). Astaxanthin protects steroidogenesis from hydrogen peroxide-induced oxidative stress in mouse Leydig cells. *Marine Drugs*, 13(3): 1375-1388.
- Waites, G.M.H. (1990). Physiology of the mammalian testis. In: *Marshall's physiology of reproduction*. Waites, G.M.H., Setchell, B.P., Lamming, G.E. editors. Vol 2, London: Churchill Livingstone, pp: 1-105.
- Zhang, P., Zheng, Y., Lv, Y., Li, F., Su, L., Qin, Y., et al. (2020). Melatonin protects the mouse testis against heat-induced damage. *Molecular Human Reproduction*, 26(2): 65-79.
- Zou, L., Cheng, G., Xu, C., Liu, H., Wang, Y., Li, N., et al. (2021). The role of miR-128-3p through MAPK14 activation in the apoptosis of GC2 spermatocyte cell line following heat stress. *Andrology*, 9(2): 665-672.
- Zuluaga Tamayo, M., Choudat, L., Aid-Launais, R., Thibaudeau, O., Louedec, L., Letourneur, D., et al. (2019). Astaxanthin complexes to attenuate muscle damage after in vivo femoral ischemiareperfusion. *Marine Drugs*, 17(6): 354.