

اثر محافظتی ژل رویال بر بافت کبد رت‌های بالغ ماده در سندرم تخمدان پلی کیستیک تجربی

زهرا قلی پور^{۱*}، وحید نجاتی^۲، غلامرضا نجفی^۳، زهرا کریم پور^۱، فرشته خانشی^۴

چکیده

زمینه و هدف: سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) یکی از اختلالات بالینی شایع است که در ۱۰-۵٪ زنان در سنین باروری مشاهده می‌شود و از علائم بالینی آن می‌توان به عدم تخمک‌گذاری، هایپرآندروژنیسم، هیرسوتیسم و مقاومت به انسولین اشاره نمود. این مطالعه با هدف تعیین اثر حفاظتی ژل رویال بر بافت کبدی در رت‌های پلی کیستیک انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۳۲ رت بالغ ماده با نژاد ویستار به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند: ۱- گروه کنترل که فقط آب و غذای معمولی دریافت کردند؛ ۲- گروه سندرم تخمدان پلی کیستیک تجربی (PCO)، که با یک‌بار تزریق عضلانی استرادیول والریت به میزان ۴mg (۰/۴ml) به ازای هر رت، این سندرم در آنها القا شد؛ ۳- گروه کنترل ژل رویال که روزانه ژل رویال را با دوز ۹۰mg/kg به‌صورت مایع خوراکی دریافت کردند؛ ۴- گروه سندرم تخمدان پلی کیستیک - ژل رویال که همانند گروه دوم تخمدان پلی کیستیک در آنها القا و با ژل رویال همانند گروه سوم تیمار شدند. دوره تیمار در این تحقیق ۶۳ روز (۹ هفته) بود. در پایان دوره، خون تمامی موش‌ها جهت آنالیز بیوشیمیایی گرفته شد و سپس بافت کبدی آنها جهت مطالعات بافتی با H&E و Sudan Black رنگ‌آمیزی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آماری واریانس یک‌طرفه و توکی صورت گرفت. سطح معنی‌داری، $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در این بررسی ژل رویال باعث کاهش ذخایر چربی سلول‌های کبدی در رت‌های گروه پلی کیستیک تجربی شد و آثار تخریبی ناشی از استرس اکسیداتیو سندرم تخمدان پلی کیستیک را در بافت کبدی رت‌های گروه پلی کیستیک تحت تیمار با ژل رویال کاهش داد.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج این مطالعه ژل رویال می‌تواند اثر حفاظتی بر بافت کبدی رت‌های پلی کیستیک داشته باشد.

کلید واژه‌ها: رت‌ها؛ ژل رویال؛ سندرم تخمدان پلی کیستیک؛ کبد.

^۱دانشجوی کارشناس ارشد بافت و جنین‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۲استادیار زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۳استادیار آناتومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۴کارشناس ارشد بافت و جنین‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

زهرا قلی‌پور، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

z_gholipour99@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۱۰

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Gholipour Z, Nejati V, Najafi G, Karimpour Z, Khaneshi F.
The protective effect of royal jelly on liver tissue of adult female rats with
experimental polycystic ovarian syndrome.
Qom Univ Med Sci J 2014;8(1):35-41. [Full Text in Persian]

مقدمه

اختلالی که امروزه به عنوان سندرم تخمدان پلی کیستیک (Polycystic Ovary Syndrom, PCOS) شناخته می شود برای اولین بار در سال ۱۸۴۴ توسط Chereau گزارش شد (۱). سندرم تخمدان پلی کیستیک از شایع ترین اختلالات غدد درون ریز است که در ۱۰-۵٪ زنان در سنین باروری دیده می شود (۲). از علائم بالینی این سندرم می توان به هایپراندرژیسم، عدم تخمک گذاری و متعاقباً ناباروری، مقاومت به انسولین، دیابت نوع ۲ و کبد چرب اشاره نمود (۳). ثابت شده است که سندرم تخمدان پلی کیستیک می تواند استرس اکسیداتیو ایجاد کند، که به نظر می رسد استرس اکسیداتیو ناشی از این بیماری به علت اختلال در سنتز استروئیدهای تخمدانی باشد (۴). سلول های بدن به صورت طبیعی دارای یک نوع مکانیسم بیولوژیکی آنتی اکسیدانی هستند (۵). استرس اکسیداتیو زمانی رخ می دهد که تعادل بین گونه های آزاد اکسیژن (ROS) و آنتی اکسیدان ها بهم خورده و باعث آسیب DNA و آپوپتوز سلولی گردد. آنتی اکسیدان ها تأثیرات مخرب رادیکال های آزاد اکسیژن را که نقش مهمی در دستگاه تولید مثلی و پاتوژنز ناباروری زنانه دارند، کاهش می دهند (۴).

کبد به عنوان یکی از بافت های پیچیده بدن نقش مهمی در متابولیسم کربوهیدرات ها، پروتئین ها و چربی ها دارد. تحقیقات مختلف نشان داده است که گونه های فعال اکسیژن می توانند آسیب های کبدی را شدت بخشند (۶). در ۴۷٪ از بیماران دچار سندرم تخمدان پلی کیستیک، کبد به صورت چرب و غیر وابسته به الکل (Non Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) دیده می شود (۷). شواهد نشان می دهد میزان آنزیم های کبدی از جمله آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) و نیز سطح سرمی تری گلیسریدها و کلسترول در بیماران با سندرم تخمدان پلی کیستیک افزایش چشمگیری داشته است (۸). ژل رویال یکی از فرآورده های زنبور عسل بوده که به صورت ماده ای سفید شیری رنگ با بوی تند و مزه ای میوه ای توسط غدد زیر حلقی زنبورهای کارگر تولید می شود و دارای ارزش غذایی فراوان است. ژل رویال ترکیباتی با فعالیت های بیولوژیکی از جمله ۲۰ اسید آمینه ضروری، کربوهیدرات ها، اسیدهای چرب

(به ویژه اسید چرب ۱۰ هیدروکسی دکانویک اسید)، مواد معدنی (به ویژه آهن، کلسیم، سدیم، پتاسیم، کرومیوم، منیزیم، نیکل) و همه ویتامین های گروه B محلول در آب مانند تیامین (B1)، ریوفلاوین (B2)، پیریدوکسین (B6)، همچنین نیاسین، بیوتین، اسید فولیک، اینوزیتول، اسید نوکلئیک، گاما گلوبولین و نیز عناصر مورد نیاز برای سلامتی را دارا می باشد (۹، ۱۰). همچنین ژل رویال با داشتن استیل کولین می تواند از رسوب کلسترول در جدار رگها که باعث سفت شدن دیواره رگها می شود، بکاهد (۱۱). در مطالعات متعدد تأثیرات آنتی اکسیدانی، ضد توموری، آنتی باکتریایی و آنتی دیابتیک ژل رویال به اثبات رسیده است (۹). به علاوه، ژل رویال دارای خواص هایوگلاسیمی بوده و کاهنده تری گلیسریدها و کلسترول خون می باشد (۱۲). در تحقیق El-Nekeety و همکاران، اثرات آنتی اکسیدانی و حفاظتی ژل رویال بر استرس اکسیداتیو ایجاد شده با فمونیسم بر روی سلول های کبدی رت نه به اثبات رسید (۶). همچنین در تحقیقات Silici و همکاران مشخص گردید ژل رویال می تواند بر روی آسیب اکسیداتیو ایجاد شده در بیضه با Cisplatin در رت های بالغ مؤثر باشد (۱۳). لذا این تحقیق با توجه به موارد ذکر شده با هدف بررسی اثر حفاظتی ژل رویال بر بافت کبد و ذخایر چربی کبدی در رت های پلی کیستیک انجام شد.

روش بررسی

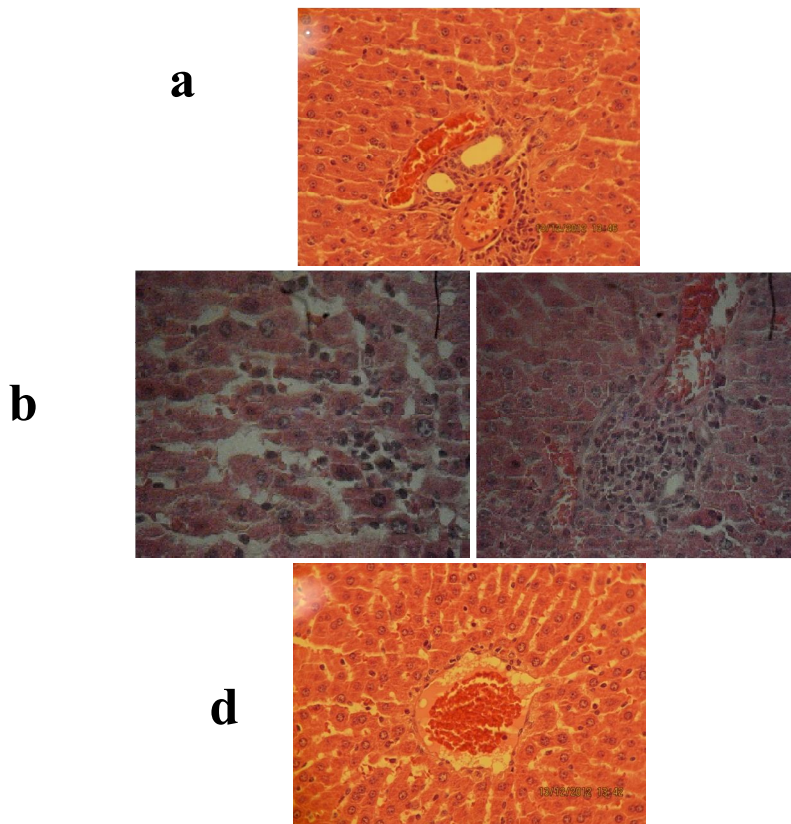
در این مطالعه ۳۲ رت بالغ ماده با نژاد ویستار، با وزن تقریبی 20 ± 200 g از حیوانخانه دانشگاه ارومیه به طور تصادفی انتخاب شدند. موش ها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در شرایط دمایی 25°C - 22°C با دسترسی آزاد به آب و غذا به مدت یک هفته برای سازش با شرایط محیط آزمایشگاه در قفس های مخصوص نگهداری و سپس به طور مساوی به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند: گروه یک به عنوان گروه کنترل که فقط آب و غذای معمولی دریافت کردند؛ گروه دوم یا گروه پلی کیستیک که در این گروه یک بار استرادیول والریت (دارو پخش - ایران) به میزان 4mg ($0/4\text{ml}$) به ازای هر موش به صورت عضلانی تزریق شد؛ گروه سوم یا گروه کنترل ژل رویال، رت های بالغی بودند که روزانه به ازای هر کیلوگرم وزن بدن خود، 90mg ژل رویال

نیز در فرمالین ۱۰٪ جهت بررسی ذخایر چربی در هپاتوسیت‌ها با کیت سودان بلک (Sudan Black) رنگ آمیزی شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری واریانس یک طرفه و توکی تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی داری، $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در رنگ آمیزی H&E در گروه کنترل و گروه ژل رویال، آرایش سلول‌های کبدی طبیعی بوده و سینوزوئیدهای کبدی در حالت نرمال بودند. کپسول کبدی از جنس بافت همبند متراکم حاوی سلول‌های همبندی به همراه تعدادی عروق خونی مشاهده گردید، اما در گروه پلی کیستیک اتساع سینوزوئیدهای کبدی به صورت غیرطبیعی افزایش نشان داد و در برخی نقاط کانون‌های التهابی اطراف عروق خونی (Prevascularinflammation) نیز دیده شد، اما در برخی نقاط نکروز سلولی در گروه‌های کنترل، چنین حالاتی مشاهده نشد (شکل شماره ۱).

محلول در آب مقطر را به صورت خوراکی دریافت کردند و گروه چهارم شامل رت‌هایی بود که مشابه گروه دوم سندرم تخمدان پلی کیستیک در آنها برانگیخته شد و به مقدار گروه سوم ژل رویال دریافت کردند. در این مطالعه ژل رویال زنبور عسل از مرکز تحقیقات کشاورزی استان آذربایجان غربی خریداری شد. طول دوره تیمار در این حیوانات ۶۳ روز (۹ هفته) بود. در پایان دوره تیمار همه رت‌ها توسط جابجایی مهره‌های گردنی آسان‌کشی شده و به طور مستقیم از قلب حیوان خونگیری به عمل آمد، سپس با دور ۱۷۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. در ادامه، سرم رت‌ها جهت سنجش فاکتورهای تری گلیسرید، کلسترول، آنزیم‌های کبدی (ALT، AST) و قند خون مورد بررسی قرار گرفت و بافت کبدی آنها نیز جهت مطالعات بافتی در فرمالین ۱۰٪ تثبیت شد. پس از طی مراحل پاساژ بافت (آبگیری، شفاف‌سازی) قالب‌گیری، اسلایدهایی به ضخامت $7\mu\text{m}$ تهیه شد و سپس توسط هماتوکسیلین - ائوزین (H&E) رنگ آمیزی و از نظر بافت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های فیکس شده

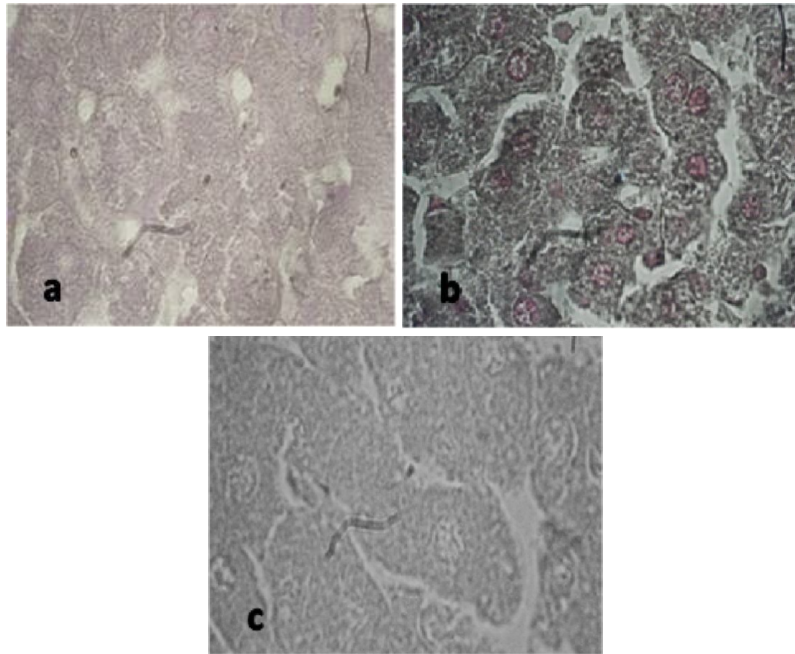


شکل شماره ۱: تصویر میکروسکوپ نوری. رنگ آمیزی H&E. بزرگنمایی $40\times$

a: گروه کنترل: مقطع بافتی کبد سالم که هیچ‌گونه ضایعه‌ای در بافت کبد مشاهده نمی‌شود. b: گروه PCOS (سندرم تخمدان پلی کیستیک تجربی) که آرایش نامنظم هپاتوسیت‌ها و نیز تکروز سلولی (فلش ۱) و اتساع سینوزوئیدها (فلش ۲)، قابل تشخیص است. c: کانون التهابی در کبد پلی کیستیک. d: گروه پلی کیستیک تیمار با ژل رویال. در این گروه بهبود در بافت کبد نسبت به گروه PCOS مشاهده می‌شود.

گروه کنترل و کمتر از گروه پلی‌کیستیک شاهد گزارش شد، اما اختلاف آماری معنی‌داری در این زمینه بین گروه‌ها مشاهده نشد (شکل شماره ۲).

در رنگ‌آمیزی Sudan Black میزان چربی در سلول‌های کبدی گروه پلی‌کیستیک بیشتر از مقدار آن در گروه‌های کنترل و پلی‌کیستیک تحت تیمار با ژل رویال بود، همچنین مقدار چربی در گروه پلی‌کیستیک تحت تیمار با ژل رویال گرچه بیشتر از



شکل شماره ۲: تصویر میکروسکوپ نوری. رنگ‌آمیزی Sudan Black. بزرگنمایی $\times 100$.
a: گروه کنترل. b: گروه PCOS که میزان بالای چربی کبد نسبت به گروه کنترل قابل رؤیت است. c: گروه پلی‌کیستیک تیمار با ژل رویال که از نظر ذخایر چربی وضعیت بهتری نسبت به گروه PCOS دارند.

همچنین اختلاف میانگین سطح سرمی تری‌گلیسرید بین گروه‌های PCOS، کنترل و کنترل ژل رویال ($p < 0/05$)، گروه‌های PCOS و PCOS تیمار با ژل رویال ($p < 0/05$)، گروه‌های کنترل و پلی‌کیستیک تیمار با ژل رویال ($p < 0/05$)، گروه‌های کنترل و ژل رویال ($p < 0/05$)، معنی‌دار بود (جدول).

اختلاف میانگین آلانین آمینو ترانسفراز، کلسترول، قند خون و آسپاراتات آمینو ترانسفراز بین گروه‌های کنترل و PCOS ($p < 0/05$)، گروه PCOS تیمار با ژل رویال ($p < 0/05$)، گروه تیمار با ژل رویال و گروه کنترل و شاهد، افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < 0/05$)، اما اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های کنترل و کنترل ژل رویال مشاهده نشد.

جدول: میزان آلانین آمینو ترانسفراز، آسپاراتات آمینو ترانسفراز، تری‌گلیسرید، کلسترول و قند خون در موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف

گروه‌ها	گروه ۱ (تعداد ۸)	گروه ۲ (تعداد ۸)	گروه ۳ (تعداد ۸)	گروه ۴ (تعداد ۸)
آلانین آمینو ترانسفراز (mg/dl)	51.75 ± 0.91^a	51.75 ± 3.79^a	110.5 ± 3.79^b	86 ± 3.65^c
آسپاراتات آمینو ترانسفراز (mg/dl)	192.25 ± 4.51^a	190.25 ± 2.6^a	246 ± 3.2^b	229.25 ± 1.25^c
تری‌گلیسرید (mg/dl)	43.50 ± 0.25^a	41.75 ± 0.85^b	84.25 ± 0.85^c	47.5 ± 0.64^d
کلسترول (mg/dl)	81.25 ± 5.39^a	79.5 ± 5.4^a	107.25 ± 2.56^b	83.25 ± 2.27^c
قند خون (mg/dl)	151.6 ± 9.03^a	149.5 ± 12.13^a	186.6 ± 9.53^b	169.6 ± 11.4^c

گروه ۱: گروه کنترل؛ گروه ۲: گروه کنترل ژل رویال؛ گروه ۳: گروه پلی‌کیستیک تجربی (PCO) و گروه ۴: گروه پلی‌کیستیک تیمار شده با ژل رویال. حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ($p < 0/05$) می‌باشد.

بحث

سندرم تخمدان پلی‌کیستیک یکی از اختلالات شایعی است که در سنین باروری با علائم کلینیکی مختلف از جمله کاهش یا عدم تخمک‌گذاری، هایپراندرژیسم و مقاومت به انسولین دیده می‌شود (۳). طی مطالعاتی ثابت شده است علائم تخمدان پلی‌کیستیک از جمله هایپراندرژیسم و مقاومت به انسولین می‌تواند استرس اکسیداتیو را در مبتلایان به این بیماری تشدید بخشد. همچنین مقاومت به انسولین در زنان با تخمدان پلی‌کیستیک به علت بالا بودن سطح قند خون و اسیدهای چرب در گردش می‌تواند تولید ROSها را تشدید کند که علت این افزایش در سنتز ROSها را ناشی از هایپرگلیسمی دانسته‌اند. همچنین ثابت شده است بیماران پلی‌کیستیک جوان و لاغر اندام که دارای سطح بالای تری‌گلیسرید هستند، سطح اکسیداتیو بالایی نیز دارند (۱۲، ۱۴). مطالعات Lee و همکاران در رابطه با استرس اکسیداتیو در بیماران پلی‌کیستیک نشان داد یک همبستگی قوی مابین این بیماری و هایپراندرژیسم، افزایش چربی‌های خون، قند خون و استرس اکسیداتیو وجود دارد (۴).

آنتی‌اکسیدان‌ها آثار تخریبی رادیکال‌های آزاد را بر روی سلول‌ها تضعیف می‌کنند و شامل دو دسته‌اند: آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی از قبیل کاتالاز و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی مانند ویتامین C، کوآنزیم Q10. همان‌گونه که قبلاً اشاره شد ژل رویال حاوی ترکیباتی از جمله ویتامین‌های رده C و اسید چرب بزرگ ۱۰ هیدروکسی دکانویک اسید می‌باشد که خواص آنتی‌اکسیدانی آن به اثبات رسیده است (۹، ۱۳). همچنین عبدالوهاب و همکاران (سال ۲۰۰۴) در مطالعه خود نشان دادند فمونیسین (FB) بر روی رت‌ها، استرس اکسیداتیو ایجاد کرده که می‌تواند اثرات سوئی روی بافت کبد رت‌های آلوده داشته باشد. در این تحقیق ژل رویال، آثار مخرب استرس ناشی از فمونیسیم را کاهش داد (۹). با توجه به اثبات تأثیر ژل رویال برای مقابله با استرس اکسیداتیو، در تحقیق دیگری نیز با در نظر گرفتن عملکرد متفورمین در تنظیم سطح انسولین بیماران پلی‌کیستیک، همچنین نقش مشخص کلسیم (Vit D-) در اصلاح و تنظیم انسولین در این سندرم؛ مصرف همزمان این دو دارو به منظور اصلاح اختلال

انسولین و کاهش آندروژن و در نتیجه بلوغ تخمک و کاهش عوارض ناشی از این بیماری پیشنهاد شده است (۱۵). همچنین در زنان دارای تخمدان پلی‌کیستیک، ذخایر چربی کبدی بالاتر از حد نرمال گزارش شده که ۴۷٪ این بیماران با چاقی مرکزی، دارای کبد چرب هستند (۷). در بیماری کبد چرب سطح ترانس آمینازهای کبدی کاهش می‌یابد، که استفاده از داروهای متفورمین و کلومیفن باعث عملکرد نرمال کبد می‌شود (۱۶). همچنین در این بیماران میزان فاکتورهایی مانند تری‌گلیسرید، کلسترول و ترانسفرازهای کبدی افزایش داشته، که در شدت دادن به آسیب‌های کبدی نقش مهمی دارند (۶).

طی تحقیقات متعدد، اثرات شبه انسولینی و هایپوگلیسمی ژل رویال به اثبات رسیده است (۱۷). مطالعات انجام‌شده در ترکیه نیز نشان داده است ژل رویال به صورت وابسته به دوز می‌تواند اثر حفاظتی در مقابل سمیت‌زایی لاندا سیالوتین روی بافت کبدی داشته و آنزیم‌های کبدی را به‌طور معنی‌دار به گروه کنترل نزدیک کند (۱۸). در نتایج مطالعات انجام‌شده در سال ۲۰۰۶ مشخص گردید فعالیت هایپوکلسترولمی ژل رویال با کاهش بیان ژن اسکوالین اپوکسیداز که یک آنزیم کلیدی در سنتز کلسترول است و افزایش لیپوپروتئین رسپتور در موش سوری، ارتباط نزدیکی دارد (۱۹). همچنین گزارش شده است ژل رویال می‌تواند به علت دارا بودن نئوپترین، اثر حفاظتی خاصی بر روی کبد ایجاد کند (۶). از طرفی، ژل رویال سنتز DNA در هپاتوسیت‌ها را تحریک کرده و مانع از آپوپتوز در کبد می‌شود که با بررسی اثر ژل رویال بر کبد تحت تأثیر CISPLATIN به این نتیجه رسیدند که در گروه تحت درمان با ژل رویال میزان آپوپتوز سلول‌ها به‌طور مشخص کاهش می‌یابد (۱۳). بنابراین، با توجه به یافته‌ها در مطالعه حاضر اثرات حفاظتی ژل رویال در بافت کبد به وضوح قابل مشاهده است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد ژل رویال با داشتن ترکیبات غنی از فعالیت‌های بیولوژیکی، عامل مؤثر در مقابل استرس اکسیداتیو ناشی از بیماری پلی‌کیستیک بوده و مصرف روزانه آن به صورت

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند تا از حمایت اساتید محترم گروه زیست‌شناسی و دامپزشکی دانشگاه ارومیه تشکر و قدردانی لازم را بجا آورند.

خوراکی می‌تواند آثار مخرب ناشی از تخمدان پلی‌کیستیک را در بافت کبد و نیز میزان انباشتگی چربی در هیپاتوسیت‌ها را تا حد قابل ملاحظه‌ای کاهش داده و از عوارض ثانویه تخمدان پلی‌کیستیک از جمله کبد چرب و دیابت نوع ۲ پیشگیری کند.

References:

1. Chereau A. Briefsto serve asa 'study of the desovaires diseases. Paris: Fortin, Masson Cie;1844.
2. Zhou R, Bird IM, Dumesic DA, Abbott DH. Adrenal hyperandrogenism is induced by fetal androgen excess in a rhesus monkey model of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 Dec; 90(12):6630-7.
3. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: Mechanism and implications for pathogenesis. *Endocrinol Rev* 1997 Dec;18(6):774-800.
4. Lee JY, Baw CK, Gupta S, Aziz N, Agarwal A. Role of oxidative stress in polycystic ovary syndrome. *Curr Women's Health Rev* 2010;(6):96-107.
5. Victor VM, Rocha M, De laFuente M. Immune Cell: Free radicals and antioxidants in sepsis. *Int Immuno Pharmacol* 2004 Mar; 4(3):327-47.
6. El-Nekeety A, El-kholy W, Abbas N, Ebaid A, Amra H, Abdel-Wahhab M. Efficacy of royal jelly against the oxidative stress of fumonisin in rats. *Toxicol* 2007 Aug; 50(2):256-69.
7. Gutierrez-Grobo Y, Ponciano-Rodríguez G, Ramos MH, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Prevalence of non alcoholic fatty liver disease in premenopausal, postmenopausal and polycystic ovary syndrome women. The role of estrogens. *Ann Hepatol* 2010;9(4):402-9.
8. Ma RC, Liu KH, Lam PM, Cheung LP, Tam WH, Ko GT, et al. Sonographic measurement of mesenteric fat predicts presence of fatty liver among subjects with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2011 Mar; 96(3): 799-807.
9. Abdel-Wahhab MA, Hassan AM, Amer HA, Naguib KM. Prevention of Fumonisin-induced maternal and developmental toxicity in rats by certain plant extracts. *J Appl Toxicol* 2004;24(6):469-74.
10. Ishii R, Horie M, Murayama M, Maitani T. Analysis of tetracyclines in honey and royal jelly by LC/MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2006 Dec; 47(6):277-83.
11. Wei W, Wei M, Kang XJ, Deng HH, Lu ZH. A novel method developed for acetylcholine detection in royal jelly by using capillary electrophoresis coupled with electrogenerated chemiluminescence based on a simple reaction. *Electrophoresis* 2009 Jun; 30(11):1949-52.
12. Vittek J. Effect of roal jelly on serum lipids in experimental animals and humans with athrosclerosis. *Experientia* 1995 Sep 29;51(9-10):927-35.
13. Silici S, Ekmekcioglu O, Eraslan G, Demirtas A. Antioxidative effect of royal jelly in Cisplatin-induced testes damage. *Urology* 2009 Sep; 74(3):545-51.
14. Kusçu NK, Var A. Oxidative stress but not endothelial dysfunction exists in non-obese, young group of patients with polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet* 2003 Apr; 268(1):45-7.
15. Pal L, Berry A, Coraluzzi L, Kustan E, Danton C, Shaw J, et al. Therapeutic implications of Vitamin D and calcium in overweight women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2012 Dec; 28(12):965-8.

16. Varela-Reya M, Embadea N, Ariza U, Shelly C, et al. Non-alcoholic steatohepatitis and animal models: Understanding the human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2009 May; 41(5):969-76.
17. Münstedt K, Bargello M, Hauenschild A. Royal jelly reduces the serum glucose levels in healthy subjects. *J Med Food* 2009 Oct; 12(5):1170-2.
18. Cavusoglu K, Yapar K, Oruc E, Yalccin E. The protective effect of royal jelly on chronic Lamda-cyhalotrin toxicity: Serum biochemical parameters, lipid peroxidation, and genotoxic and histopathological alteration in swiss albino mice. *J Med Food* 2011 Oct; 14(10):1229-37.
19. Kamakura M, Moruyoma T, Sakaki T. Change in hepatic gene expression associated with hypocholesterolaemic activity of royal jelly. *J Pharm Pharmacol* 2006 Dec; 58(12):1683-9.