Applied molecular biology
Vol.4, issu.6, Spring. 2025
p.p 71-96

The effect of crocin on improving testicular tissue function in adult rats treated with alcohol

Azadeh Kakooli[*1], **Akbar Karimi***[2]
1. MS.c,Department of biology, payame noor university, Tehran, Iran.
(Corresponding Author1: azadeh.k2020@gmail.com, orcid: 0000-0003-4513-6174)
2. Department of biology, payame noor university, Tehran, Iran.(Corresponding Author2: akbarkarimi@pnu.ac.ir)
Article history:
Received:01/05/2025 Revised:15/05/2025 Accepted:09/06/2025

Abstract
The present study aimed to determine the therapeutic effects of the drug Crocina on testicular tissue function, spermatogenesis processes, and sex hormones during alcohol consumption in adult male rats. The animals used in this experiment consisted of 48 adult male rats, which were divided into 6 groups of 8. After 28 days, direct blood sampling from the hearts of the samples was performed to measure sex hormones. The results obtained indicated that the concentration of testosterone hormone in the positive control group receiving alcohol decreased. The consumption of Crocina can reduce the negative effects caused by alcohol consumption and lead to an increase in testosterone hormone, ultimately resulting in a significant increase in the number of spermatogenesis lineage cells, namely spermatogonia, spermatocytes, spermatids, and sperm in adult male rats treated with alcohol.

Keywords: Crocina drug, testicular tissue, sex hormones, spermatogenesis, alcohol, rats

زیست‌شناسی مولکولی کاربردی
سال چهارم/ شماره ۶/ بهار ۱۴۰۴
صفحات : ۷۱-۹۶

تأثیر داروی کروسینا بر بهبود عملکرد بافت بیضه در موش‌های صحرایی بالغ تحت تیمار با الکل

آزاده کاکولی*[۱]، اکبر کریمی[۲]
۱. کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
(نویسنده مسئول۱: orcid:0000-0003-4513-6174 azadeh.k2020@gmail.com,)
۲. استادیار،گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
(نویسنده مسئول۲:akbarkarimi@pnu.ac.ir)
تاریخ بارگزاری: ۱۴۰۴/۰۲/۱۱ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۱۲

چکیده

داروی کروسینا با نام علمی Crocus. Houssknechtii است که ماده اصلی آن را زعفران تشکیل می‌دهد. زعفران دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که از آن به‌عنوان اینتگراتور ضدافسردگی استفاده می‌شود. همچنین کاروتنویید‌های موجود در زعفران به‌ویژه کروسین و کروستین که آنتی‌اکسیدان است، با جلوگیری از فعالیت ROS از اکسیداسیون اسیدهای چرب در غشا جلوگیری کرده و باعث افزایش تحرک و بهبود مورفولوژی اسپرم و همچنین عملکرد جنسی آقایان می‌شود. مصرف نوشیدنی‌های الکلی یکی از مشکلات جدی است که سلامت جامعه بشری را به مخاطره می‌اندازد و در جامعه مصرف روزافزونی دارد. اتانول باعث کاهش فعالیت سیستم عصبی مرکزی می‌شود و دارای اثرات روان‌گردان قابل‌توجهی است که موجب بروز اختلال در سیستم تولیدمثلی می‌شود؛ بنابراین، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثرات بهبودی داروی کروسینا بر روی عملکرد بافت بیضه طی مصرف الکل انجام شد. حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده در

این آزمایش ۴۸ سر موش صحرایی نر بالغ بودند که به ۶ گروه ۸تایی تقسیم شدند. پس از پایان روز ۲۸، خون‌گیری مستقیم از قلب نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری هورمون‌های جنسی انجام شد. نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه نشان داد که غلظت هورمون تستوسترون در گروه شاهد مثبت دریافت‌کننده الکل کاهش یافت و مصرف داروی کروسینا می‌تواند اثرات منفی ناشی از مصرف الکل را کاهش دهد. با توجه به نتایج مصرف داروی کروسینا که باعث افزایش تستوسترون شد، این امر باعث افزایش معنادار در تعداد سلول‌های دودمان اسپرماتوژنز نیز شده است.

کلمات کلیدی: داروی کروسینا، بافت بیضه،هورمون‌های جنسی، اسپرماتوژنز، الکل، موش صحرایی

مقدمه

مصرف نوشیدنی‌های الکلی یکی از مشکلات جدی است که سلامت جامعه بشری را به مخاطره می‌اندازد. آمارها نیز حاکی از مصرف زیاد الکل در جامعه است. اتانول باعث کاهش فعالیت سیستم عصبی مرکزی می‌شود و دارای اثرات روان‌گردان قابل‌توجیهی حتی در دوزهای بسیار پایین است. نتایج تحقیقات علوم پایه و بالینی نیز نشان‌دهنده نقش این مواد در بروز نارسایی و اختلال در سیستم تولیدمثلی است[۱۵]. آتروفی بیضه، کاهش تعداد اسپرم‌ها، اختلال در قابلیت حرکت اسپرم، مورفولوژی ناقص اسپرم و افزایش تعداد اسپرم‌های ناهنجار از جمله عوارض مصرف مزمن نوشیدنی‌های الکلی است[۲۱]. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که استفاده بیش از حد از الکل در مردان می‌تواند باعث اختلال در انقباض بیضه‌ها شود (آتروفی بیضه‌ها)[۵]. این تغییرات می‌تواند منجر به ناتوانی جنسی و ناباروری شود. تحقیقات نیز کاهش تستوسترون مرتبط با مصرف الکل را به اثبات رساندند. همچنین سطوح LH نیز کاهش یافت و این دلالت بر این داشت که الکل نه‌تنها بر بیضه‌ها، بلکه روی غدد هیپوتالاموس و هیپوفیزهم عمل می‌کند[۱]. متعاقباً مطالعات بر روی موش‌های صحرایی که الکل به آن‌ها خورانده می‌شد نشان داد که افزایش در سطوح LH خون، نتیجه آسیب و تخریب در سلول‌های

لایدیگ و کاهش تولید و ترشح تستوسترون است[۱۳]. تحقیقات همچنین نشان داده است که مصرف الکل، سطح FSH در خون را کاهش می‌دهد. تغییرات در شکل‌گیری اسپرم ممکن است با کاهش باروری در مردان مصرف‌کننده الکل همراه باشد. علاوه بر این با توجه به اختلال ناشی از الکل عملکرد سلول سرتولی و کاهش سطوح تستوسترون انتظار می‌رود سطح FSH افزایش یابد چون FSH بخشی از فیدبک منفی مکانیسم مشابه LH است. در نتیجه سطوح نرمال FSH در واقع برای همراهی با تستوسترون بسیار کم در نظر گرفته می‌شود[۱۶]. اسپرماتوژنز و بیوسنتز آندروژن‌ها دو تا از مهم‌ترین عملکردهای بیضه در پستانداران است[۲۳]. اسپرماتوژنز فرایند پیچیده‌ای است که طی آن جمعیت مستقلی از سلول‌های تخم تمایزنیافته تحت تکثیر و بلوغ قرار می‌گیرند تا اسپرماتوزوای هاپلویید عملکردی را تشکیل دهند[۱۰]. در موش صحرایی اسپرماتوژنز در چهارمین روز بعد تولد، از تغییر گونوسیت‌ها به اسپرماتوگونی نوع A شروع می‌شود. در حقیقت در موش صحرایی نر بالغ، مدت چرخه اپی‌تلیوم منی‌ساز حدود ۱۱ روز در بالغین (۱۲ روز و زمان لازم برای تولید اولین اسپرماتوزوا از سلول‌های دودمانی ۴۱-۴۶ روز (در بالغین ۴۸ روز) است[۱۷]. تحقیقات نشان می‌دهد مصرف الکل می‌تواند باعث کاهش معنی‌داری در سطح سرمی هورمون تستوسترون در موش‌های آزمایشگاهی شود[۱۴]. همچنین می‌تواند اثرات مخربی روی غده پروستات داشته باشد که منجر به اختلال در بیان گیرنده‌های آندروژنی و استروژنی در استروما و بخش ترشحی این غده شود. همچنین اتانول با تأثیر بر سلول‌های لایدیگ که ترشح‌کننده هورمون تستوسترون است سطح این هورمون را در خون کاهش می‌دهد و سبب اختلال در عملکرد سیستم تناسلی و کاهش صفات ثانویه جنسی در جنس مذکر می‌شود[۲۳]. مصرف مزمن الکل اغلب با کاهش میل و توانایی جنسی، تأخیر در انزال یا زودانزالی، ناباروری و آتروفی بیضه همراه است[۸]. قطر نامنظم لوله‌های منی‌ساز و تعداد بالای سلول‌های مرده در لومن لوله‌های منی‌ساز افراد الکلی نیز مورد توجه قرار گرفته است. مصرف اتانول باعث اختلال در عملکرد RNA و DNA[۷] و اختلال در تکثیر سلول‌های جنسی در موش‌های نر بالغ می‌شود[۱۲]. همچنین خاصیت ضداسپرماتوژنزی و کاهش‌دهندگی حرکات سلول‌های جنسی در افراد الکلی مورد تأیید قرار گرفته است [۱۹]. مصرف حاد

و مزمن الکل باعث افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. تولید رادیکال‌های آزاد در میتوکندری موش ثابت شده است[۲۰]. دیواره سلولی و مولکول DNA به‌عنوان مهم‌ترین اهداف رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) در اسپرم و سایر سلول‌های بدن هستند. ارتباط مستقیمی بین ROS و آپوپتوز اسپرم‌ها وجود دارد. در کسانی که الکل مصرف می‌کنند مورفولوژی غیرنرمال هسته و آپوپتوز اسپرم مورد انتظار است. پراکسیداسیون چربی موجب ناهنجاری در قطعه میانی اسپرم و از دست دادن ظرفیت آکروزوم در لقاح می‌شود و در نهایت توان باروری کاهش می‌یابد[۶]. ROS یکی از دلایل کاهش ناباروری مردان است به این ترتیب که ROS به‌ویژه رادیکال‌های آزاد باعث پراکسیداسیون اسیدهای چرب و آسیب به غشای سلولی اسپرم و محتوای ژنتیکی آن می‌شود؛ در نتیجه باعث مختل شدن تحرک اسپرم و آسیب به DNA می‌شود که این می‌تواند منجر به لقاح ضعیف شود.

گیاهان دارویی که حاوی مواد با خواص آنتی‌اکسیدانی هستند در کاهش لیپوپروتئینه‌ای سرم خون در حیوانات تغذیه شده اثرات بارزی دارند. در پژوهش حاضر اثر داروی کروسینا بر فرایند اسپرماتوژنز بافت بیضه و هورمون‌های جنسی در موش‌های صحرایی بالغ تحت تیمار با الکل مورد بررسی قرار گرفت. داروی کروسینا با نام علمی Crocus. Houssknechtii است که ماده اصلی آن را زعفران تشکیل می‌دهد. زعفران دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که از آن به‌عنوان اینتگراتور ضدافسردگی استفاده می‌شود. همچنین کاروتنوییدهای موجود در زعفران به‌ویژه کروسین و کروستین که آنتی‌اکسیدان می‌باشند با جلوگیری از فعالیت ROS از اکسیداسیون اسیدهای چرب در غشا جلوگیری کرده و باعث افزایش تحرک و بهبود مورفولوژی اسپرم و همچنین عملکرد جنسی آقایان می‌شود[۱۱]. نتایج مطالعات مختلف اثرگذاری عصاره زعفران در موش‌ها را مورد بررسی قرار داده است. در این مطالعه اثر محافظتی عصاره اتانولی زعفران بر تغییرات بیوشیمیایی و پاتولوژی بافت کبد در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد عصاره زعفران دارای اثرات محافظتی از بافت کبد در دیابت ناشی از استرپتوزوتوسین است[۳]. در مطالعه صالحی و شریف‌آباد[۴] اثرات تغذیه با عصاره آبی زعفران (Crocus sativus) بر

کاهش چربی خون و جلوگیری از آسیب کبدی در موش‌های صحرایی نر هیپر لیپیدمیک نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در گروهی که از عصاره گیاه زعفران استفاده کرده بودند مقادیر کلسترول LDL و آنزیم‌های کبدی ALT &AST نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (P>0/5) و نتایج تحقیقات در نهایت نشان دادند که این عصاره در کاهش ریسک فاکتورهای کبد چرب می‌تواند مؤثر باشد. ازاین‌رو با توجه به مصرف روزافزون الکل در جامعه و تأثیر مخرب آن بر بافت بیضه و هورمون‌های جنسی، این تحقیق به بررسی اثر داروی کروسینا بر فرایند اسپرماتوژنز، بافت بیضه و هورمون‌های جنسی در موش‌های صحرایی بالغ تحت تیمار با الکل پرداخت.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد استفاده و روش نگهداری از آن‌ها

حیوانات مورد استفاده در این تحقیق ۴۸ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با وزن تقریبی ۱۸۰-۲۰۰ گرم و سن ۲,۵ تا ۳ ماه بود و از خانه پرورش حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه گردید که به‌طور تصادفی در ۶ گروه قرار داده شدند.

گروه‌بندی حیوانات

۱. گروه کنترل: حیوانات این گروه در طی دوره آزمایش از آب و غذای استاندارد به‌صورت نامحدود استفاده کردند و هیچ‌گونه دارویی دریافت نکردند.

۲. گروه شاهد مثبت: این گروه به مدت ۲۸ روز، روزانه ۲ cc محلول آب و الکل ۳۰٪ به‌صورت گاواژ دریافت کردند.

۳. گروه شاهد منفی: این گروه به مدت ۲۸ روز روزانه ۶۰mg محلول کروسینا به‌صورت گاواژ دریافت کردند.

۴. گروه تجربی اول: این گروه به مدت ۲۸ روز روزانه ۱۵mg محلول کروسینا در نوبت صبح و ۲cc محلول آب و الکل ۳۰ درصد در نوبت بعدازظهر به‌صورت گاواژ دریافت کردند.

۵. گروه تجربی دوم: این گروه به مدت ۲۸ روز روزانه ۳۰mg محلول کروسینا در نوبت صبح و ۲cc محلول آب و الکل ۳۰ درصد در نوبت بعدازظهر به‌صورت گاواژ دریافت کردند.
۶. گروه تجربی سوم: این گروه به مدت ۲۸ روز روزانه ۶۰mg محلول کروسینا در نوبت صبح و ۲cc محلول آب و الکل ۳۰ درصد در نوبت بعدازظهر به‌صورت گاواژ دریافت کردند.

روش تجویز عصاره

برای تجویز عصاره از سرنگ دارای فیدر استفاده شد. حیوانات هر روز در ساعات معینی از صبح و بعدازظهر گاواژ داده شدند.

وزن کردن حیوانات

جهت بررسی تأثیر احتمالی داروی کروسینا بر وزن حیوانات در ابتدای دوره آزمایش و همچنین قبل از خون‌گیری وزن شدند و مشخصات وزنی آن‌ها یادداشت شد (شکل۱ب).

خون‌گیری

خون‌گیری بدین‌صورت انجام شد که پس از بیهوش کردن حیوانات با کتامین و اطمینان از بیهوش شدن موش‌های صحرایی، قفسه سینه را شکافته و با سرنگ 5cc از ناحیه بطن چپ قلب خون‌گیری انجام شد. سپس سرم خون توسط دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه جداسازی و تا زمان سنجش هورمونی در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

روش جداسازی و نگهداری از بیضه‌ها

پس از خون‌گیری بدن حیوان برش زده شد تا بیضه‌ها از قسمت اسکروتوم جدا و چربی و اپی‌دیدیم از بیضه‌ها جدا شد. سپس بیضه‌های چپ و راست پس از وزن‌کشی هر کدام

در ظروف جداگانه که حاوی فرمالین بودند، قرار داده شد. فرمالین نقش تثبیت‌کننـده را ایفا می‌کند.

الف ب پ

شکل۱. الف) طریقه گاواژ دادن، ب) خون‌گیری از قلب، پ) بیضه موش

اندازه‌گیری هورمون‌ها به روش الایزا

برای اندازه‌گیری غلظت هورمون‌های FSH و LH و تستوسترون از روش الایـزا اسـتفاده شد. جهت مطالعه هیستومورفولوژیکی بیضـه، ابتـدا کـل بافـت از نظـر تـراکم لولـه‌های اسپرم‌ساز و همچنین مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفت. سـپس از ۵ قسـمت مختلـف بافت به‌طور تصادفی ۵ لوله اسپرم‌ساز انتخاب شده و در هر کدام ۴/۱ لوله در نظر گرفته شد. سپس تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید شمارش شد و نتیجه حاصل در عدد ۴ ضرب گردید تا تعداد کل این سلول‌ها در یک لوله به‌دست آیـد. سپس میانگین اعداد به‌دست آمده در ۵ لوله اسلایدها برای هر رده سلولی، حساب شـد. همچنین تراکم اسپرم‌ها در لوله‌های اسپرم‌ساز انتخاب شده مورد مطالعه قـرار گرفـت و نیز تعداد سلول‌های بینابینی بین این لوله‌ها و لوله‌های مجاور شـمارش شـد و میـانگین آن‌ها نیز به‌دست آمد. در مرحله آخر توسـط میکروسـکوپ دوربـین‌دار، فتـومیکروگراف مربوطه تهیه شد و نتایج آماری به‌دست آمده نیز مورد بررسی قرار گرفت.

تحلیل آماری داده‌ها

برای تحلیل میانگین‌ها از روش تحلیـل واریـانس (Anova) اسـتفاده شـد. درصـورتی‌که میانگین‌ها اختلاف داشتند از آزمون TUKEY برای مقایسه دو به دو میانگین‌ها استفاده

شد و هر کدام از میانگین‌ها با میانگین گروه کنترل مقایسه شد. تمامی تجزیه و تحلیل‌های آماری براساس جدول SPSS انجام گرفت و سطح معنی‌دار بودن نتایج، حداقل با (P<0/05) در نظر گرفته شد.

نتایج

تأثیر دارو بر وزن بدن

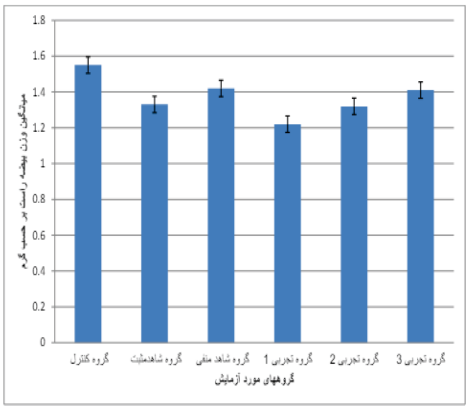
تغییرات وزن بدن در انتهای آزمایش در گروه‌های مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است. میانگین وزن بدن در گروه‌های تجربی نسبت به گروه میانگین وزن بدن در گروه کنترل تغییرات خاصی را نشان نمی‌دهد.

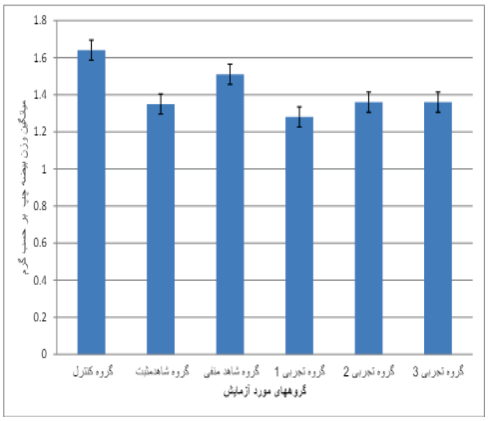
جدول ۱. مقایسه میانگین وزن بدن (برحسب گرم)
در انتهای آزمایش گروه‌های تجربی با گروه کنترل

گروه‌های مختلف مورد آزمایش	تعداد	انحراف معیار ـ میانگین وزن بدن برحسب گرم
گروه کنترل	۶	۲۴۲/۲۵±۱۲/۹
گروه شاهد مثبت	۶	۳۵±۲۳۱/۸
گروه شاهد منفی	۶	۲۸±۲۱۹/۶
گروه تجربی ۱	۶	۱۹±۲۱۰/۷۳
گروه تجربی ۲	۶	۲۱۸/۱۵±۷۵/۹۱
گروه تجربی ۳	۶	۲۱۸/۲۲±۲۵/۴۲

تأثیر داروی کروسینا بر وزن بیضه‌ها

تغییرات وزن بیضه راست و چپ بعد از انجام آزمایش در گروه‌های مختلف در شکل۲ نشان داده شده است. میانگین وزن بیضه راست و چپ در گروه‌های تجربی نسبت به میانگین وزن بیضه در گروه کنترل کاهش نشان داده است ولی این کاهش در سطح (P<۰/۰۵) معنادار نیست.



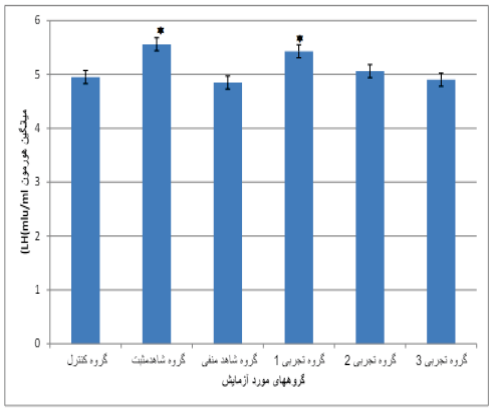


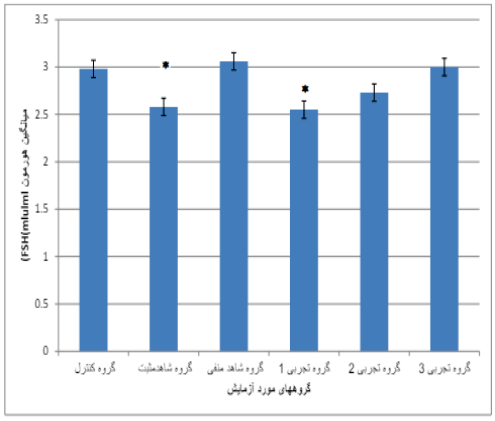
الف ب

شکل۲. مقایسه میانگین وزن بیضه راست و چپ در گروه‌های تجربی دریافت‌کننده مقادیر مختلف داروی کروسینا در مقایسه با گروه کنترل: الف) بیضه راست، ب) بیضه چپ. براساس میانگین خطای معیار میانگین آورده شده است.

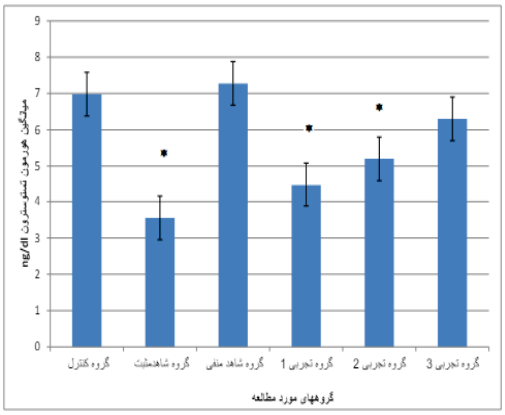
تأثیر مقادیر مختلف داروی کروسینا بر میانگین غلظت سرمی هورمون‌ها

تغییرات غلظت سرمی هورمون FSH ، تستوسترون و LH بعد از انجام آزمایش در گروه‌های مختلف در شکل۳ نشان داده شده است. میانگین غلظت سرمی هورمون LH در گروه‌های شاهد مثبت و تجربی ۱ نسبت به میانگین غلظت سرمی هورمون LH، FSH و تستوسترون در گروه‌های کنترل افزایش معناداری را در سطح (P<۰/۰۵) نشان می‌دهد.





(الف) (ب)

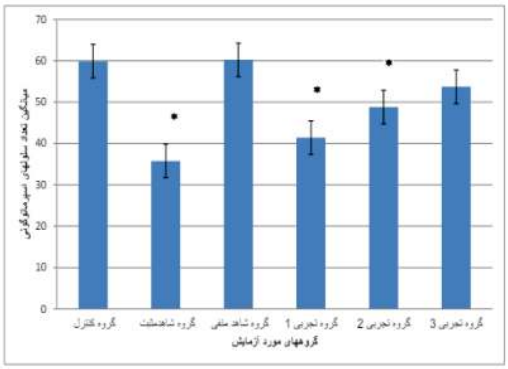


(پ)

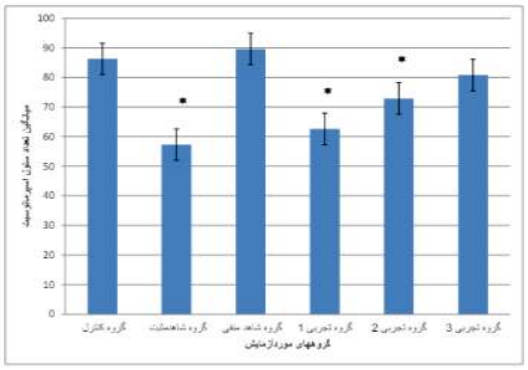
شکل۳. مقایسه غلظت سرمی هورمون‌ها در گروه‌های تجربی دریافت‌کننده مقادیر مختلف داروی کروسینا: الف)LH ، ب) FSH، پ) تستوسترون، نمودار براساس میانگین خطای معیار میانگین آورده شده است. علامت نشان‌دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل است (P<۰/۰۵).

تغییرات تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و بینابینی در مقطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز بعد از انجام آزمایش در گروه‌های مختلف در شکل۴ نشان داده شده است. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و بینابینی در یک لوله در گروهای تجربی ۱ و ۲ و شاهد مثبت نسبت به کنترل کاهش معنی‌دار نشان می‌دهد. همچنین گروه تجربی ۱ و ۲ نسبت به گروه شاهد منفی کاهش معنی‌داری را در میانگین تعداد سلول‌های دودمان زایا در سطح (P<۰/۰۵) نشان می‌دهند.

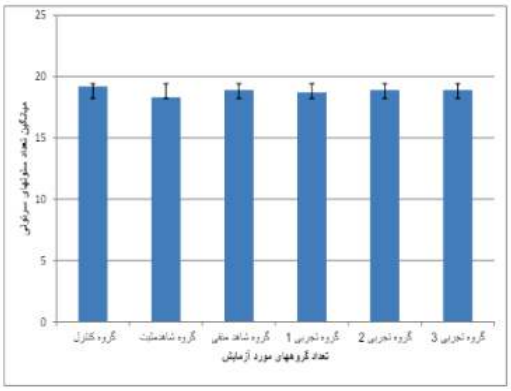
تغییرات تعداد سلول‌های سرتولی در مقطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز بعد از انجام آزمایش در گروه‌های مختلف در شکل ۴پ نشان داده شده است. میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در یک لوله در گروه‌های تجربی نسبت به میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در گروه کنترل اختلاف معناداری را نشان نمی‌دهد.



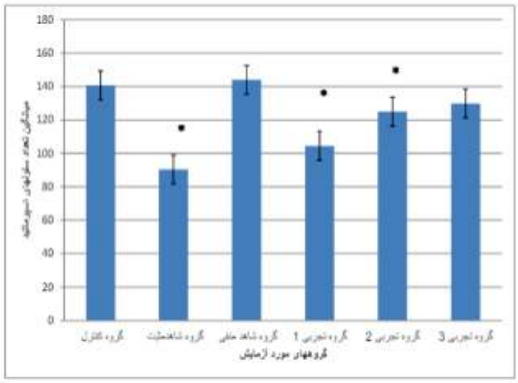
(الف)



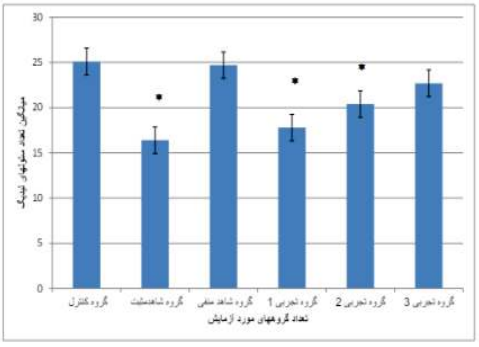
(ب)



(پ)



(ت)

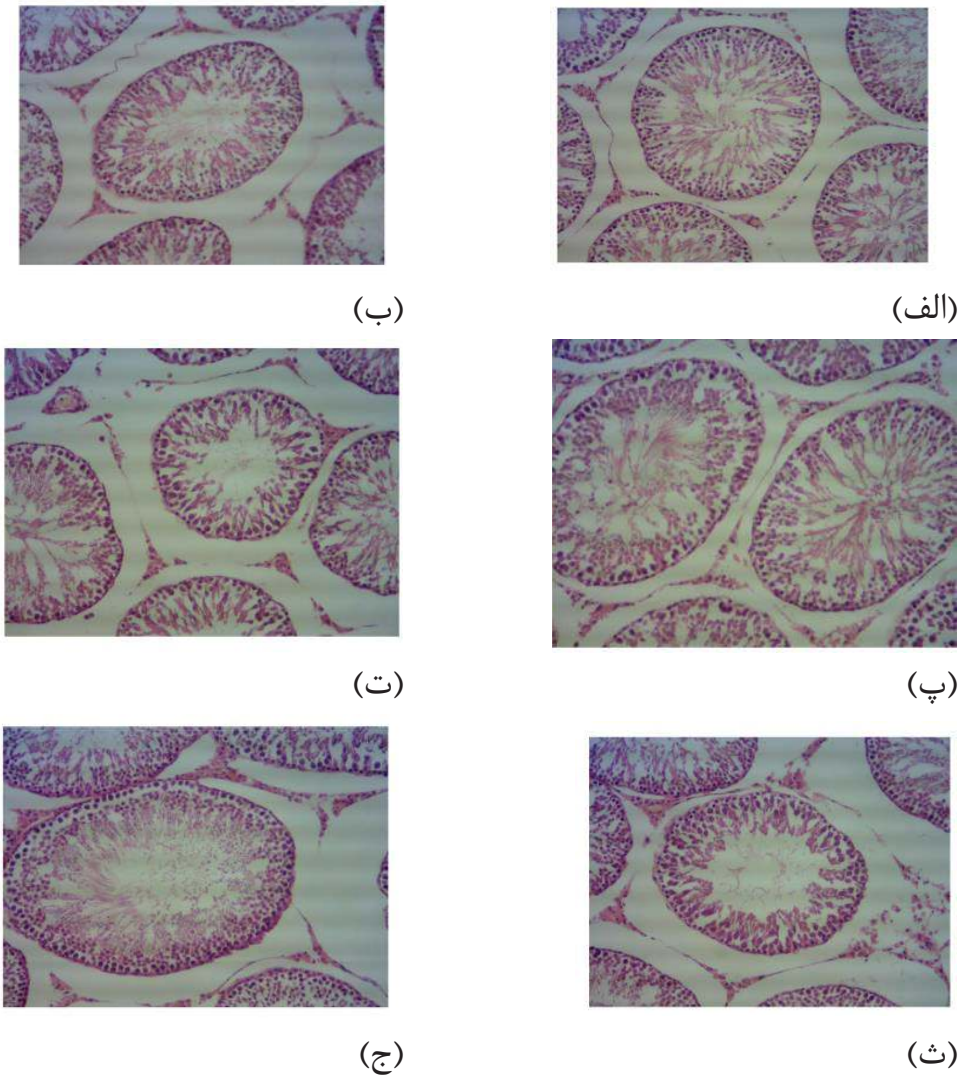


(ث)

شکل۴. مقایسه غلظت سرمی سلول‌ها در گروه‌های تجربی دریافت‌کننده مقادیر مختلف داروی کروسینا: الف) اسپرماتوگونی، ب) اسپرماتوسیت، پ) سرتولی، ت) اسپرماتید، ث) بینابینی.
نمودار براساس میانگین خطای معیار میانگین آورده شده است
علامت نشان‌دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل است ($P<۰,۰۵$)

مطالعات میکروسکوپی: بررسی لوله‌های اسپرم‌ساز

در گروه کنترل لوله‌های اسپرم‌ساز با تراکم زیاد، فاصله کم و مرتب در بافت بیضه دیده می‌شوند. این سلول‌ها دارای شکلی گرد و با تراکم سلولی زیاد و آرایش مرتب قرار گرفته بودند. درون این لوله‌ها تمایز سلولی از اسپرماتوگونی تا اسپرم بالغ با نظم و آرایش مرتب دیده می‌شوند. همچنین تراکم اسپرم‌ها در مرکز لوله بالاست (شکل ۵ الف). بررسی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه شاهد مثبت و مقایسه آن با این لوله‌ها در گروه کنترل نشان می‌دهد که شکل گرد و آرایش منظم سلولی و تراکم سلولی زیاد در این گروه نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرده است (شکل ۵ ب). بررسی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه منفی و مقایسه آن با این لوله‌ها در گروه کنترل نشان می‌دهد که تغییرات بافتی در لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه شاهد منفی نسبت به گروه کنترل از نظر ساختار لوله‌های اسپرم‌ساز، تعداد، اندازه فضای بینابینی و تراکم سلول‌های درون لوله انجام نگرفته است (شکل ۵ پ). بررسی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه تجربی ۱ و مقایسه آن با این لوله‌ها در گروه شاهد مثبت نشان می‌دهد که تغییرات بافتی از نظر تعداد اندازه فضای بینابینی ساختار لوله‌های اسپرم‌ساز و تراکم سلول‌های درون لوله انجام گرفته است (شکل ۵ ت). بررسی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه تجربی ۲ و مقایسه آن با این لوله‌ها در گروه تجربی ۱ نشان می‌دهد که تغییرات چندانی از نظر تعداد، اندازه فضای بینابینی و ساختار لوله‌های اسپرم‌ساز صورت نگرفته است (شکل ۵ ث). بررسی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه تجربی ۳و مقایسه آن با این لوله‌ها در گروه تجربی ۱ نشان می‌دهد که تغییرات بافتی از نظر تعداد، اندازه فضای بینابینی ساختار لوله‌های اسپرم‌ساز تراکم سلول‌های درون لوله انجام گرفته است (شکل ۵ ج).



شکل ۵. فوتومیکروگراف لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه‌ها، بزرگ‌نمایی ×۱۰۰: الف) کنترل، ب) شاهد منفی، پ) شاهد مثبت،
ت) تجربی ۱، تجربی ۲، ج)تجربی ۳

بررسی سلول‌های اسپرماتوگونی

در گروه کنترل سلول‌های اسپرماتوگونی به‌صورت مشخص و تیپیک بر روی غشای پایه لوله منی‌ساز مشخص بودند. سیتوپلاسم این سلول‌ها روشن و هسته آن‌ها غالباً پر کروماتین است (شکل ۶ الف). فیتومیکروگراف تهیه شده از مقطع عرضی لوله‌های

اسپرم‌ساز در گروه شاهد مثبت، منفی و مقایسه آن با گروه کنترل نشان می‌دهد که تغییرات بافتی در سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه شاهد مثبت نسبت به گروه کنترل از نظر اندازه تعداد ویژگی‌های سیتوپلاسم و هسته و میزان رنگ‌پذیری آن‌ها انجام گرفته است و در گروه شاهد منفی انجام نگرفته است (شکل ۶ ب و پ). بررسی این سلول‌ها در مقطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه تجربی ۱، ۲ و ۳ و مقایسه آن با گروه کنترل نشان می‌دهد که در سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه تجربی ۱، ۲ و ۳ نسبت به گروه کنترل از نظر اندازه، تعداد ویژگی‌های سیتوپلاسم و هسته و میزان رنگ‌پذیری آن‌ها از نظر آماری کاهش معناداری داشته است و در گروه ۳ معنادار نبوده است (شکل ۶ ت، ث، ج).

بررسی سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه

اسپرماتوگونی نوع B، سلول‌های اجدادی است که به اسپرماتوسیت اولیه تمایز می‌یابد. اسپرماتوسیت اولیه دارای ۴۶ کروموزوم (XY+۴۴) است این سلول‌ها مدت کوتاهی بعد از تشکیل وارد مرحله پروفاز نخستین تقسیم میتوزی می‌شوند. اسپرماتوسیت‌های اولیه بزرگ‌ترین سلول‌های دودمان اسپرماتوژن هستند. در گروه کنترل این سلول‌ها به خوبی و با تراکم طبیعی مشخص بودند (شکل ۶ الف). فتومیکروگراف تهیه شده از مقطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه شاهد مثبت، منفی و مقایسه آن با گروه کنترل بررسی نشان می‌دهد که تغییرات بافتی در سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه در گروه شاهد مثبت نسبت به گروه کنترل از نظر تعداد ویژگی‌های سیتوپلاسم و هسته و میزان رنگ‌پذیری آن‌ها انجام گرفته است و در گروه شاهد منفی انجام نگرفته است (شکل ۶ ب و ت). بررسی این سلول‌ها در مقطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه تجربی ۱ و ۲ و مقایسه آن با گروه کنترل نشان می‌دهد که در سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه در گروه تجربی ۱ و ۲ نسبت به گروه کنترل از نظر تعداد ویژگی‌های سیتوپلاسم و هسته و میزان رنگ‌پذیری آن‌ها کاهش صورت گرفته و در گروه ۳ نسبت به گروه تجربی ۱ افزایش صورت گرفته است (شکل ۶ ت، ث و ج).

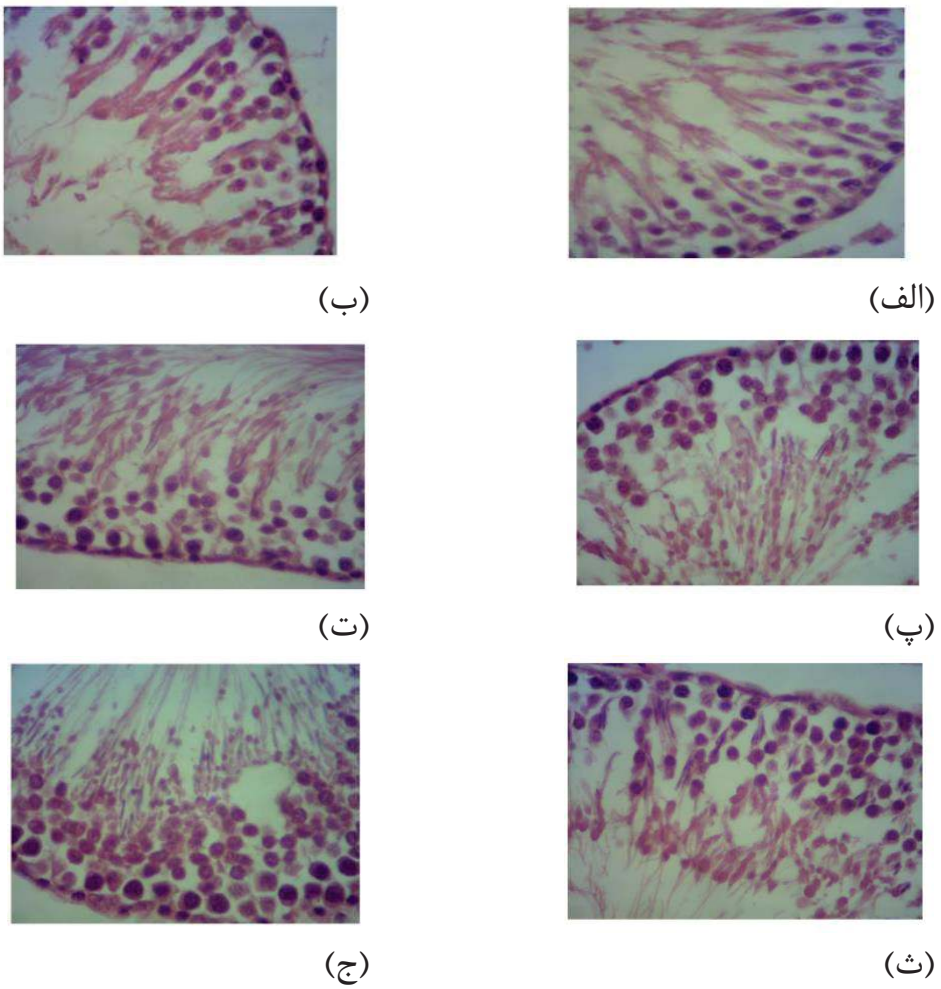
بررسی سلول‌های اسپرماتید

مشاهده اسپرماتوسیت‌های ثانویه در برش‌های بافتی مشکل است، چون این سلول‌ها دارای عمر کوتاه بوده و در مدت زمان بسیار کوتاهی در مرحله اینترفاز باقی مانده و سریع وارد مرحله تقسیم دوم میوزی می‌شوند که به همین علت در گروه کنترل و سایر گروه‌ها، این سلول‌ها مشاهده نشد. از تقسیم هر اسپرماتوسیت ثانویه، دو اسپرماتید به‌وجود می‌آید. این سلول‌ها دارای ۲۳ کروموزوم هستند. اسپرماتیدها را می‌توان به کمک اندازه کوچک آن‌ها و هسته حاوی بخش‌های کروماتینی متراکم تشخیص داد. محل آن‌ها درون لوله‌های منی‌ساز نزدیک مجاری داخلی است. در گروه کنترل اسپرماتیدها با تعداد زیادی در مقطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز به چشم خورد (شکل ۶ الف). بررسی فتومیکروگراف تهیه شده از مقطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه شاهد مثبت، منفی و مقایسه آن با گروه کنترل نشان می‌دهد که در سلول‌های اسپرماتید در گروه شاهد مثبت و منفی نسبت به گروه کنترل از نظر تعداد کاهش معناداری صورت گرفته است (شکل ۶ ب و پ). بررسی این سلول‌ها در مقطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه تجربی ۱، ۲ و ۳ و مقایسه آن با گروه شاهد مثبت نشان می‌دهد که در سلول‌های اسپرماتید در گروه تجربی۱، ۲ و ۳ نسبت به گروه شاهد مثبت از نظر اندازه و تعداد تغییر و افزایش صورت گرفته است (شکل ۶ ت و ث و ج).

بررسی سلول‌های سرتولی

بافت پوششی منی‌ساز علاوه بر سلول‌های دودمان اسپرماتوژنز که در اسپرماتوژنز شرکت می‌کند، شامل نوع دیگری از سلول‌ها به نام سلول‌های سرتولی یا سلول‌های پشتیبان است. این سلول‌ها به‌صورت ستون‌های بلندی هستند که قاعده آن‌ها بر روی سطح درونی غشا پایه لوله‌های منی‌ساز چسبیده و رأس‌شان متوجه مرکز است. هسته بیضی‌شکل و کم‌رنگ سلول نزدیک قاعده قرار دارد و محتوی هتروکروماتین اندکی است (شکل ۶ الف). بررسی فتومیکروگراف تهیه شده از مقطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه شاهد مثبت و مقایسه آن با گروه کنترل نشان می‌دهد که تغییرات بافتی کمی در سلول‌های سرتولی در گروه شاهد مثبت نسبت به گروه کنترل صورت گرفته است (شکل ۶ ب). فتومیکروگراف تهیه شده از مقطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه شاهد منفی

و مقایسه آن با گروه کنترل نشان می‌دهد که در سلول‌های سرتولی در گروه شاهد منفی نسبت به گروه کنترل از نظر اندازه، تعداد تغییری صورت نگرفته است (شکل ۶ پ). بررسی این سلول‌ها در مقطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه تجربی ۱، ۲ و ۳ و مقایسه آن با گروه کنترل نشان می‌دهد که تغییرات بافتی معناداری در سلول‌های سرتولی در گروه تجربی ۱، ۲ و ۳ نسبت به گروه کنترل از نظر تعداد، اندازه و ویژگی‌های ظاهری صورت نگرفته است (شکل ۶ ت، ث و ج).



شکل ۶. فوتومیکروگراف سلول‌های اسپرماتوگونی اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید و سلول‌های سرتولی در گروه‌های مختلف،
بزرگ‌نمایی ۴۰۰: الف) کنترل، ب) شاهد مثبت، پ)شاهد منفی، ت) گروه تجربی ۱، ث) گروه تجربی ۲، ج) تجربی ۳.

بحث

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مشاهده شد که دریافت داروی کروسینا در گروه تجربی ۱ و ۲ و ۳ تأثیر معنی‌داری بر میانگین وزن بدن نسبت به گروه کنترل ندارد. به‌دلیل وجود ترکیبات موجود در زعفران وزن موش‌ها به‌تدریج کاهش می‌یابد؛ زیرا زعفران در بدن باعث مهار آنزیم لیپاز پانکراس می‌شود که به‌دنبال آن از هضم چربی موجود در رژیم غذایی جلوگیری می‌کند که در نتیجه کاهش محتوای کالری را به‌دنبال دارد. عملکرد زعفران به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان و سرکوب‌کننده سیتوکین‌های التهابی باعث کاهش وزن می‌شود. زعفران با تأثیر بر افزایش احساس سیری باعث مصرف کمتر مواد غذایی شده و همچنین میزان متابولیسم گلوکز و لیپید را افزایش می‌دهد[۲].

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مشاهده شد که دریافت داروی کروسینا در گروه تجربی ۱، ۲ و ۳ تغییر معنی‌داری بر میانگین وزن بیضه‌ها نسبت به گروه کنترل و همچنین نسبت به یکدیگر در پایان آزمایش ندارد. تغییرات غلظت سرمی هورمون تستوسترون بعد از انجام آزمایش در گروه‌های مختلف نشان داده شده است میانگین غلظت سرمی هورمون تستوسترون در گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد. محققان کاهش هورمون تستوسترون را به کاهش میزان تولید آن و افزایش تجزیه و حذف هورمون تستوسترون از خون نسبت دادند. به‌عنوان مثال در موش‌های صحرایی نر، سالم یک دوز الکل منجر به کاهش عمیق در سطح تستوسترون شد که تا ۹۶ ساعت به طول انجامید. اختلال در سیستم‌های هورمونی دیگر نیز ممکن است به سرکوب الکل ناشی از سطوح تستوسترون کمک کند. گروه تجربی ۳ نیز نسبت به تجربی ۱ افزایش معنادار داشته که نشانه حفاظت بیشتر کروسینا بر روی بافت بیضه است. تغییرات غلظت سرمی هورمون FSH بعد از انجام آزمایش در گروه‌های مختلف نشان داده شده است. میانگین غلظت سرمی هورمون FSH در گروه‌های شاهد مثبت و تجربی ا نسبت به میانگین غلظت سرمی هورمون FSH در گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد. کاهش تعداد اسپرم‌ها (اسپرماتوگونی اسپرماتوسیت و اسپرماتید عاملی در جهت کاهش هورمون FSH به‌دلیل تغذیه آن‌ها از سلول‌های سرتولی است. اگر طول دوره آزمایش بیشتر بود احتمال پاسخ فیدبک منفی FSH برای حمایت و نگهداری دودمان اسپرم‌ساز از طریق سلول

سرتولی فراهم می‌شد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده میانگین غلظت سرمی هورمون LH در گروه‌های شاهد مثبت و تجربی ۱ نسبت به میانگین غلظت سرمی هورمون LH در گروه کنترل افزایش معناداری را نشان می‌دهد. سطوح کاهش‌یافته تستوسترون باید افزایشی را به‌عنوان نتیجه‌ای از مکانیسم فیدبک تنظیم‌کننده محور HPG در سطوح LH برانگیزد. در نتیجه افزایش نسبی در سطوح LH در موارد بسیاری دلالت بر این داشت که الکل نه‌تنها بر بیضه‌ها بلکه روی غدد هیپوفیز و هیپوتالاموس هم عمل می‌کند. متعاقباً مطالعات در موش‌های صحرایی که الکل به آن‌ها خورانده می‌شد نشان داد که افزایش در سطوح LH خون، نتیجه آسیب سلول‌های لایدیگ و کاهش در تولید و ترشح تستوسترون است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق مشاهده می‌شود که داروی کروسینا باعث کاهش میزان LH بالارفته ایجاد شده با مصرف الکل می‌شود.

همچنین تأثیر داروی کروسینا بر تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی اسپرماتوسیت و اسپرماتید در یک لوله تغییرات تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی اسپرماتوسیت و اسپرماتید نشان می‌دهد که در گروه‌های شاهد مثبت و تجربی ۱ و ۲ نسبت به کنترل، کاهش معنی‌دار دیده می‌شود. غلظت بالای تستوسترون در تقسیم اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت اولیه نقش دارد[۱۸]؛ بنابراین از آنجا که در این تحقیق میزان تستوسترون در گروه دریافت‌کننده الکل کاهش‌یافته میزان اسپرماتوسیت و اسپرماتوگونی نیز دچار کاهش شده است. با توجه به نتایج مصرف داروی کروسینا می‌تواند باعث افزایش تستوسترون شده و این امر باعث افزایش معنادار در تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت در لوله شده است. همچنین تغییرات تعداد سلول‌های اسپرماتید در مقطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز بعد از انجام آزمایش در گروه‌های مختلف نشان داده شده است. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروه شاهد مثبت و تجربی ۱ و ۲ نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد. تحقیقات نشان می‌دهد که مصرف زیاد الکل منجر به جلوگیری از توسعه و بلوغ اسپرم کاهش شمارش آن و اشکال غیرطبیعی اسپرم می‌شود و در ۵۰ درصد موارد باعث تغییر تحرک اسپرم می‌شود[۲۱]. همین امر موجب شده تا تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروه

دریافت‌کننده الکل به میزان زیادی کاهش یابد که با عدم مصرف الکل و مصرف داروی کروسینا میزان تستوسترون افزایش می‌یابد که این امر موجب افزایش در تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت و در نهایت افزایش تعداد سلول‌های اسپرماتید شد.

تغییرات تعداد سلول‌های بینابینی در مقطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز بعد از انجام آزمایش در گروه‌های مختلف نشان داده شده است. میانگین تعداد سلول‌های بینابینی در گروه شاهد مثبت و تجربی ۱ و ۲ نسبت به کنترل، کاهش معناداری را نشان می‌دهد. مطالعات مختلف اثرات مخرب اتانول بر محور هیپوتالاموسی‌ـهیپوفیزی‌ـگنادی را نشان داده‌اند[۲۲]. این ماده با تأثیر بر سلول‌های لایدیگ که ترشح‌کننده هورمون تستوسترون هستند سطح این هورمون را در خون کاهش داده و سبب اختلال در عملکرد سیستم تناسلی و کاهش صفات ثانویه جنسی می‌شود[۱۳] که با عدم مصرف الکل و مصرف داروی کروسینا میزان فعالیت سلول‌های لایدیگ و ترشح تستوسترون افزایش می‌یابد.

تغییرات تعداد سلول‌های سرتولی در مقطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز بعد از انجام آزمایش در گروه‌های مختلف نشان داده شده است. میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در گروه‌های شاهد مثبت و تجربی ۱ و ۲ و ۳ نسبت به گروه کنترل تغییر معناداری را نشان نمی‌دهد. سلول‌های سرتولی در دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز وجود دارند و با ترشحات خود تمایز اسپرم‌ها را هدایت می‌کنند و در همه مراحل اسپرم‌سازی پشتیبانی و تغذیه سلول‌های جنسی و نیز بیگانه‌خواری باکتری‌ها را برعهده دارند. این سلول‌ها مقاوم‌ترین سلول‌ها در تولیدمثل مذکر هستند که این مقاومت به‌دلیل داشتن اجسام شارکو بوچرز است. البته در دوزهای بالاتر الکل و مدت زمان بیشتر سلول‌های سرتولی نیز تحت تأثیر منفی الکل قرار می‌گیرند[۱]. ترکیبات کاروتنوییدی از جمله کروسین در عصاره زعفران دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی هستند که در بیوسنتز هورمون‌های استروییدی نقش دارند؛ ازاین‌رو می‌توانند در غلظت هورمون‌های جنسی نر و از جمله اسپرم‌سازی نقش داشته باشند. همچنین کروسین‌های زعفران با افزایش غیرمستقیم بیان m-RNA آنزیم گاما گلوتامیل سیستئیل سنتاز میزان گلوتاتیون احیا شده درون سلول را افزایش می‌دهد که در تنظیم فعالیت پراکسیدازی لیپیدها و آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مؤثری دارد.

زعفران با تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی علاوه بر این‌که موجب کاهش استرس‌های اکسیداتیو می‌گردد، می‌تواند بر افزایش طول عمر اسپرماتوزوئیدها و تعداد اسپرماتوزوئیدهای زنده نیز تأثیر داشته باشد[۹].

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که تراکم اسپرم تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت، اسپرماتید و لایدیگ در گروه مصرف‌کننده الکل کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است و تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید در گروه تجربی ۳ با دوز ۶۰mg/kg، نسبت به تجربی ۱ افزایش معناداری داشته است که نشانه حفاظت بیشتر کروسینا بر بافت بیضه است. غلظت بالای تستوسترون در تقسیم اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت نقش دارد از آنجا که در این تحقیق میزان تستوسترون در گروه دریافت‌کننده الکل کاهش‌یافته میزان اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید نیز دچار کاهش شده است. با توجه به نتایج مصرف داروی کروسینا باعث افزایش تستوسترون شده و این امر باعث افزایش معنادار در تعداد سلول‌های دودمان اسپرماتوژنز شده است. تحقیقات نشان داده است که مصرف زیاد الکل منجر به جلوگیری از توسعه و بلوغ اسپرم کاهش شمارش آن و اشکال غیرطبیعی اسپرم می‌شود. همین امر موجب شد تا تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروه دریافت‌کننده الکل به میزان زیادی کاهش یابد که با عدم مصرف الکل و مصرف داروی کروسینا میزان تستوسترون افزایش می‌یابد که این امر موجب افزایش در تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و در نهایت افزایش تعداد اسپرماتیدها شد.

منابع

۱. احمدی، ع و شجاع‌زاده، ش. (۱۳۹۳). «بررسی اثر الکلیسم تجربی بر ساختار بیضه و تأثیر آن بر کیفیت منی در مدل موش سوری بالغ»، مجله *پزشکی ارومیه*، دوره ۲۶، شماره ۲، ۱۳۹۳،ص۱۱۲-۱۲۰.

۲. پرماسی، م، عبیری، م و شه دوست فرد، ف. (۱۳۹۴). *زعفران طلای سرخ بررسی ترکیبات*

شیمیایی، روش‌های استخراج خواص و کاربرد کنفرانس بین‌المللی یافته‌های نوین پژوهش در علوم مهندسی و فناوری با محوریت پژوهش‌های نیازمحور مشهد.

۳. رهبانی توبر، م و مهاجری، د. (۱۳۹۰). «تأثیر عصاره اتانولی زعفران بر هیستوپاتولوژی و شاخص‌های آسیب بافت کبد در موش صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین». مجله *دامپزشکی دانشگاه آزاداسلامی*، شماره ۳، ص۱۳۰۵-۱۳۱۵.

۴. صالحی، الف و مروتی شریف‌آباد، م. (۱۳۹۵). «اثرات تغذیه با عصاره آبی زعفران (Crocus sativius L) بر کاهش چربی خون و جلوگیری از آسیب کبدی در موش‌های صحرایی نر هیپرلیپیدمیک». چهارمین کنفرانس پژوهش‌های کاربردی در علوم کشاورزی تهران مؤسسه آموزش عالی نیکان.

5. Adler, R.A., (1992). "Clinical review33:Clinically important effects of alcohol on endocrine function". *The jornal of clinical endocrinology and metabolism,* Vol. 74, No. 5, p.957-960.
6. Aitken, R.J., (1994). "West, K., Buckingham, D. Leukocytic infiltration in to the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress and sperm function". *J Androl*, Vol. 15, p.343-52.
7. Bielawski, D.M., Zaher, F.M., Svinarich, D.M., Abel, E. L., (2003). "Paternal alcohol exposure effects sperm cytosine methyle transferase messenger RNA levels". *Alcohol clin*. Exp Res, Vol. 26, No. 3, p.347-51.
8. Boyden, T.W., (1983). "Pamenter, R.W. Effects of ethanol on the male hypothalamic pituitary-gonadol axis". *Endocr Rew*, Vol. 4, No. 4, p.389-396.
9. Cao, L.C., Leers Sucheta, S., Azhar, S., (2004). "aging alters the functional expression of enzymatic and Non- enzymatic anti-oxidant defens systems in testicular rat Leyding cell". *The Jornal Of Steroid Biochemistry And Molcular Biology*, Vol. 88, p.199-203.
10. Decruz, S.C., Vaithinathan, S., Jubendradass, R., Mathur, P.P., (2010). "Effects of plants and plant Productes on the testis". *Asian J Androl*, Vol. 12, No. 4, p.468-479.
11. Dua, J., Prasad, D.N., Tripathi, A., Gupta, R., "Role of traditional medicine in Neuro psychopharmacology". *Asian Journal of pharmaceutical and clinical Reserch*, Vol. 2, No. 2, p.72-76.
12. EL- sokkary G.H., (2001). "Quantitative study on the effects of chronic ethanol administration the testis of adult male rats". *Neuro endocrinol let*. Vol. 22, No. 2, p.93-9.
13. Emanuele, M..A., Emanuele, N.V., (1998). *Alcohols effects on male reproduction Alcohol health And research wold*, Vol. 22, p.195-201.
14. Favaro, W.J., Cagnon, V.H., (2008). "Immunolocalization of androgen and oestrogen reseptores in the ventral lobe of rat prostate after long-term treatment

with ethanol and nicotine". *Int J Androl*. Vol. 31, No. 6, p.609-61.
15. Florek, E., Marszalek, A., (1999). *An experimental study of the influences of tobacco smoke on frtility and reproduction Hum Exp Toxical*, Vol. 18, No. 4, p.272-8.
16. Guerin, P., Mouatassim, S., Menezo, Y., (2001). "Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preim plantation embryo and its surrounding". *Human reprod update*, Vol. 7, p.175-89.
17. Lagarrigue, M., Becker, M., Lavigne, R., Deininger, S.O., Walch, A., Aubry, F., Suckau, D. Pineau, C., (2011). *Revisiting rat spermatogenesis with MALDI imaging at 20 um resolution Molcular and Cellular Proteomics*, Vol. 10, No. 3, P.M110.005991.
18. Meistrich, M,L., Kangasniemi, M., (1997). *Hormon treatment after irradiation stimulates recovery of rat spermatogenesis from surviving*. Vol. 18, p.80-87.
19. Srikanth, V., Malini, T., Arunakaran, J., Govindarajulu, P., & Balasubramanian, K., "Effect of ethanol treatment on epididymal secretory products and sperm maturation in albino rats". *J Pharmacol Exp ther*, Vol. 288, No. 2, p.509-15.
20. Vernet, P., Fulton, N., Wallace, C., Aitken, R. J. (2001). "Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa". *Biology of Reproduction*, Vol. 65, No. 4, p.1102-1113.
21. Villalta, J., Ballesca, J. L., Nicolas, J. M., Martinez de Osaba, M. J., Antunez, E., Pimentel, C., (1997). "Testicular function in asymptomatic chronic alcoholics: relation to ethanol intake". *Alcoholism*: *Clinical and Experimental Research*, Vol. 21, No. 1, p.128-134.
22. Wälimäki, M., & Ylikahri, R. H., (1985). "Endocrine effects of alcohol". *Prog Alcohol Res*, Vol. 1, p.265-286.
23. Wang, R.S., Yeh, S., Tzeng, C.R., Chang, C., (2009). "Androgen reseptor roles in spermatogenesis And fertility: lessons from testicular cell-specific androgen reseptor knockout mice". *Endocrine reviews*, Vol. 30, p. 119-132.