تاثیر اسیدهای چرب ضروری روغن ذرت و بادام زمینی بر روند اسپرماتوژنز در موش صحرایی

میرزا علی نظری نیا[1و3]، مسعود علیرضایی[1و2]، محمد بلوچ[3]، علی حائری روحانی[3]، شیما نعمتی[1]

1- مرکزتحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان
2- بخش بیوشیمی، آموزشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان
3- بخش زیست شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تحقیقات تهران شمال

یافته / دوره یازدهم / شماره 5 / زمستان 88 / ویژه نامه گیاهان دارویی

چکیده

Ø **مقدمه**: دانه های روغنی با داشتن اسیدهای چرب غیر اشباع و اشباع بر روی فرآیندهای اسپرماتوژنز در بیضه موثرند.

Ø **مواد و روش ها**: در این تحقیق از 21 عدد موش صحرایی نر تازه از شیر گرفته شده، هر گروه (کنترل، روغن ذرت، روغن بادام زمینی) به تعداد 7 موش در یک قفس به مدت سه ماه استفاده شد. تغذیه موش ها بصورت 10 درصد (w/w) غذای روزانه از روغن ذرت و روغن بادام زمینی در گروهای درمان صورت گرفت. پس از رسیدن به مرحله بلوغ با مشاهدات ماکروسکوپی در پایان 3 ماهگی، آزمایشات هورمون شناسی، مقاطع بافتی از بیضه تهیه شده و بررسی اندازه گیری های وزنی و حجم بیضه در هر 3 گروه از موش ها صورت گرفت.

Ø **یافته ها**: نتایج نشان داد که کاهش معنی داری در میزان هورمون تستسترون و FSH درگروههای درمان نسبت به کنترل دیده میشود($P<0,001$) در حالیکه این تفاوت معنی دار در مورد هورمون LH و حجم بیضه در گروه روغن ذرت ($P<0,001$) و در گروه روغن بادام زمینی ($p< 0,05$) نسبت به گروه کنترل می باشد، هم چنین کاهش وزن بیضه در گروههای درمان نسبت به کنترل مشاهده گردید اما این تفاوت معنی دار نبود.

Ø **بحث و نتیجه گیری**: در مجموع مطالعه حاضر نشان میدهد که مصرف روغن ذرت و بادام زمینی احتمالا" بخاطر وجود اسیدهای چرب غیر اشباع بویژه آراشیدونیک اسید که به نوبه خود پیش ساز پروستا گلندین ها می باشد می توانند با تا ثیر بر روی متابولیسم پایه و افزایش فعالیت انسولین در بافت بیضه باعث ازدیاد تکثیر سلولی در لایه اسپرماتوگونی لوله های سمینفر و افزایش روند اسپرماتوژنز شده اما به دنبال آن موجب ایجاد توقف در تبدیل اسپرماتوسیت به اسپرماتوزوئید(مرحله میوتیک اسپرماتوژنز) در لوله های سمینفر گردند.

Ø **واژه های کلیدی**: روغن ذرت، روغن بادام زمینی، اسپرماتوزنز، موش صحرایی

آدرس مکاتبه: خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، آموزشکده دامپزشکی، بخش بیوشیمی
پست الکترونیک: Alirezaei_m54@yahoo.com

مقدمه

با نگاه کلی به مقالات مختلف و کتب منتشر شده در سال‌های گذشته نشان داده می‌شود که روغن ذرت و بادام زمینی دارای اسیدهای چرب ضروری لینولئیک، اولئیک به مقدار زیاد و آراشیدونیک به مقدار کمتر می‌باشند. مطالعات در مورد اثرات روغن‌های ذرت و بادام زمینی بر روی بافتها و اندامهای مختلف از جمله پانکراس، دستگاه تناسلی ماده، جسم زرد و فولیکولهای تخمدان، غدد فوق کلیه و سیستم قلبی-عروقی، انتقال اسیدهای چرب در جفت، تکامل زخمهای نئوپلاستیک، مجاری پستانی و غدد آندوکرینی صورت گرفته است(1).

مطالعه بر روی اسیدهای چرب ضروری و اثر آن بر روی رشد و بلوغ جنسی خرگوشهای آزمایشگاهی نشان داده است که دانه های روغنی به دلیل دارا بودن اسید لینولئیک فراوان و آراشیدونیک مختصر محرک رشد و بلوغ جنسی می‌باشند(2). همچنین گزارشاتی مبتنی بر اثرات تومورزایی و تحریک رشد دستگاه تناسلی و بلوغ جنسی در مورد روغن ذرت وجود دارد. از طرفی وجود اسید آراشیدونیک موجود در فسفولیپید غشاء (فراوان‌ترین اسید چرب غیراشباع) فعالیت انسولین و متابولیسم پایه را افزایش می‌دهد(3). پروستاگلندین‌ها می‌توانند از اسیدهای چرب ضروری اسید لینولئیک و اسید آراشیدونیک (که در روغن ذرت و بادام زمینی وجود دارد) سنتز شوند و بسیاری از اعمال بیولوژیکی تولید مثلی حیوانات تغذیه شده با روغن ذرت و بادام زمینی تحت تأثیر پروستاگلندین قرار گرفته است(1).

مطالعات قبلی با استفاده از $F_2\alpha$ و PGE_1 به صورت تزریق متوالی 15 روز به صورت منفرد کاهش اسپرمیوژنز را در موش مشاهده کردند و کاهش معنی‌دار در وزن غدد تولید مثل از جمله سمینال وزیکول و تعداد اسپرماتوزوئیدها نتیجه گرفتند گرچه درصد وزنی بیضه و اپی‌دیدیم تغییر معنی‌داری را نشان نداد و مشخص گردید که احتمالاً پروستاگلندینها در ممانعت از ترشح تستوسترون عمل کرده و از این طریق روی اسپرمیوژنز اثر می‌گذارند. همچنین با تزریق درون‌بطنی $PGF_{2\alpha}$ ضمن ایجاد دهیپرترمی در موش صحرایی این نتیجه را بیان داشته اند که مکانیزم عمل $PGF_{2\alpha}$ از طریق ساختمانهای مغزی نورآدرنرژیک و آدرنوسپتورها می‌باشد و با بلوکه کردن این رسپتورها اثرات $PGF_{2\alpha}$ در مغز کاهش یافت (4).

بنابراین با توجه به موارد فوق به نظر می رسد که اثرات اسید آراشیدونیک و لینولئیک بصورت توام بر فعالیت تولید مثلی (مرحله میوتیک اسپرماتوژنز) همراه با آزمایشات اندازه گیری حجم و وزن بیضه ها و مطالعه میکروسکوپیک مقاطع بافتی و آزمایشات هورمون شناسی در فعالیت تولید مثلی جنس نر تا کنون صورت نگرفته است و از طرفی با توجه به مصرف تبلیغاتی زیاد این روغنها در جامعه کنونی لازم است اثرات احتمالی آنها بر روی ناباروری مشخص گردد. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات اسیدهای چرب ضروری موجود در روغن ذرت و بادام زمینی بر روی فعالیت بلوغ (اسپرماتوژنز در مرحله میوتیک) در مدل حیوانی موش صحرایی بود.

مواد و روش ها

الکل مطلق، تولوئن، فرمالین، اسید پیکریک، اسید استیک، اسید سیتریک، هماتوکسیلین و ائوزین، گلیسرین ، هیدرات کلرال، ژلاتین، آلوم پتاسیم و یدات سدیم از شرکت مرک (آلمان) خریداری گردید، کیت‌های هورمونی تستوسترون LH و FSH از شرکت پارس آزما (ایران) تهیه شد و روغن ذرت و بادام زمینی از محل آزمایشگاه مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی تهران فراهم گردید.

در این تحقیق از 21 عدد موش صحرایی نر تازه از شیر گرفته شده (تهیه شده از انستیتوی پاستور) در شرایط کنترل

شده دما 2 ±20 درجه سانتیگراد و دوره نوری12ساعت تاریکی و 12 ساعت روشنایی با دسترسی آزاد به آب و پلت تهیه شده از کارخانه دانه پارس دام استفاده گردید و بخش ملاحظات اخلاقی به تائید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی لرستان رسید.

حیوانات مورد استفاده در 3 قفسه جداگانه که هر قفس 7 موش در داخل آن قرار می گرفت تقسیم شدند: گروه یک بعنوان کنترل فقط از غذای آزمایشگاهی استفاده کرد و گروه بادام زمینی بعنوان گروه بادام زمینی، علاوه براستفاده از غذای آزمایشگاهی به میزان 10 درصد غذای روزانه روغن بادام زمینی استفاده و گروه ذرت بعنوان گروه روغن ذرت، علاوه براستفاده از غذای آزمایشگاهی به میزان 10 درصد غذای روزانه از روغن ذرت بصورت مخلوط در غذا روزانه استفاده کرد (2). موشها هر 10 روز یک‌بار وزن گردیده و با توجه به میانگین وزنی جیره آنها تنظیم می‌شد. رفتار حیوانات در طول مدت آزمایش نیز تحت نظر قرار گرفت که مشخص گردید در سن 3 ماهگی موشها کاملاً آمادگی باروری را داشته و در این مرحله موش‌ها از نظر رفتارشناسی به سن کافی بلوغ رسیده بودند بطوریکه بیضهٔ آنها کاملاً مشخص و در کیسهٔ اسکروتوم در قسمت عقب بدن قابل مشاهده بود. پس از سه ماهگی موشها با اتر بی‌هوش‌شدند و موشها را به پشت خوابانده و از زیر قلب آن توسط سرنگ انسولینی خون‌گیری انجام شد و برای آزمایشات هورمون شناسی فرستاده شد(اندازه گیری هورمونهای تستسترون ,LH , FSH . با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (STAT FAX , 2100, USA) به روش ELISA اندازه گیری شد.

برای خارج کردن بیضه ها، با استفاده از قیچی و گیرهٔ مخصوص آنها را از جلوی اپیدیدیم برش داده و سپس از داخل پردهٔ آلبوژینه مجزا کرده و بیضه‌ها بلافاصله در داخل سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و وزن (ترازوی با دقت گرم 0,0001) و حجم بیضه ها (با استفاده از استوانه مدرج) اندازه‌گیری شد (نمودار 1و2). سپس بیضه‌های هر گروه به مدت 48 ساعت در داخل محلول بوئن جهت پایدار شدن بافت بیضه قرار داده شد و پس از تهیه نمونه از هر گروه تقریباً تعداد 30 لام با استفاده از میکروتوم(Leitz, Germany) با تیغه ثابت، برشهای سریال به ضخامت 5 میکرومتر تهیه گردید و پس از چسباندن با چسب آلبومین با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین _ائوزین رنگ گرفتند. و مشاهدهٔ میکروسکوپی و تفسیر لامها با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی 4و40انجام شد (شکل1و2).

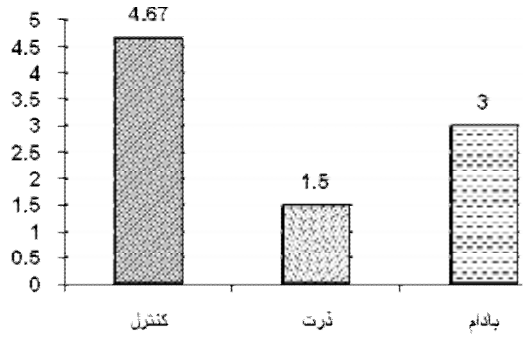
نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 11,5 و تست پارامتریک آماری One-Way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت، مقایسه ی جفت گروهها با استفاده از آزمون دانکن انجام گرفت و سطح معنی دار P<0,05 در نظر گرفته شد.

یافته ها

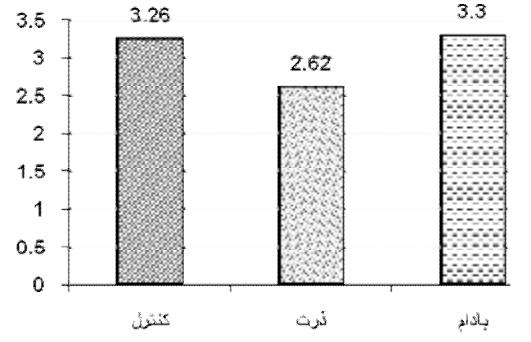
در مورد میانگین حجمی بیضه ها تفاوت معنی داری بین گروهها وجود داشت، اما این تفاوت در مورد وزن بیضه ها دیده نشد گرچه کمترین وزن بیضه در گروه ذرت مشاهده گردید (نمودار 1و2). نمودار 3 سطح هورمون FSH را در گروههای مختلف نشان می دهد که تفاوت معنی داری در دو گروه درمان نسبت به کنترل وجود دارد(P<0,001)، همچنین اندازه گیری سطح هورمون LH در هرسه گروه بیانگر وجود تفاوت معنی دار بین دو گروه درمان نسبت به گروه کنترل می باشد(نمودار 4) درحالیکه اندازه گیری سطح هورمون تستسترون بیانگر تفاوت معنی دار دو گروه درمان نسبت به کنترل می باشد(P<0,001).

با توجه به لامهای تهیه شده از برشهای متفاوت بافت بیضه و تهیه فتومیکروگراف از آنها مشخص شد که در گروه کنترل لوله های سمینفر از لحاظ مجرا دار شدن در مرحله عقب تری نسبت به دو گروه درمان هستند و در این گروه بلوغ لوله های سمینفر به زمان بیشتری نیاز دارد، یعنی اینکه اسپرماتوژنز در گروههای درمان به جلو افتاده است(شکل 1). بزرگنمایی 40 نشان می‌دهد که اندازه سلول‌های اسپرماتوگنی و اسپرماتوسیت‌ها از کنارۀ توبول به سمت مرکز در گروههای درمان بزرگ‌تر و رنگ‌پذیرتر نسبت به گروه کنترل هستند. در برش بافتی لوله سمینیفر بیضه گروه روغن ذرت و گروه روغن بادام زمینی تراکم سلول‌ها در قسمت کنار لوله سمینفر بیشتر از مرکز لوله که اسپرماتوزوا هستند بوده و در جدار لوله فضای بین سلولی کمتری مشاهده می‌شود و علائمی از حالت ازدیاد سلولی و یا تودۀ سلولی متراکم را نشان می‌دهد اما مقایسۀ برش لولۀ بیضه گروه روغن ذرت و بادام زمینی در مرکز لوله سمینفر با گروه کنترل نشان می‌دهد که تراکم اسپرماتوزوا در گروه کنترل بیشتر و این بیانگر توقف مرحله اسپرمیوژنز در گروههای درمان است(شکل 2).

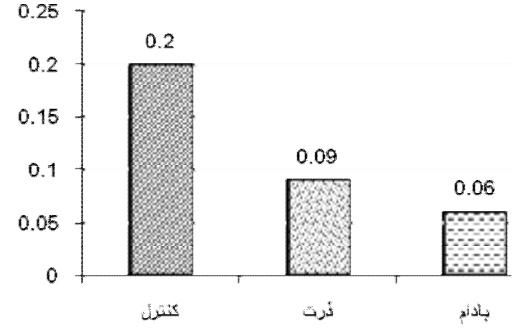
بیضه در گروهای مختلف با بزرگنمایی 40: اندازه سلول‌های اسپرماتوگنی و اسپرماتوسیت‌ها از کنارۀ توبول به سمت مرکز در گروههای روغن ذرت و بادام زمینی بزرگ‌تر و رنگ‌پذیرتر هستند و علائمی از حالت ازدیاد سلولی و یا تودۀ سلولی متراکم را نشان می‌دهند اما در مرکز توبول سلولهای اسپرماتوزوئید کاهش یافته اند. مقایسۀ برش لولۀ سمینفر بیضه گروه روغن ذرت و روغن بادام زمینی هم نشان می‌دهد که تراکم سلول در گروه روغن ذرت بیشتر و اندازۀ سلول‌ها کوچک‌تراست.



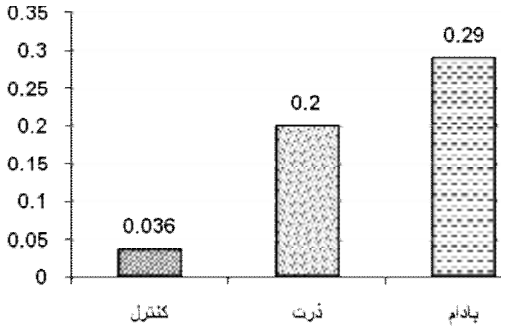
نمودار شماره 1- میانگین± انحراف معیارحجمی بیضه (برحسب سانتیمتر مکعب)در گروهای کنترل، روغن ذرت (p<0/001) و روغن بادام زمینی (p<0/05) بیانگر تفاوت معنی دارنسبت به گروه کنترل می باشد



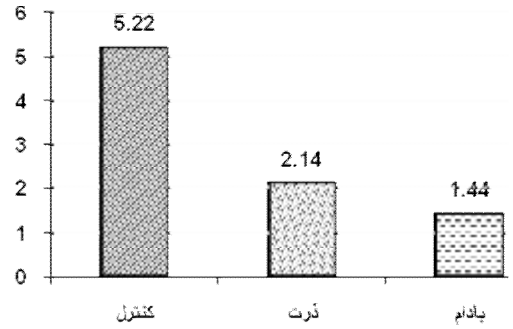
نمودار شماره 2- میانگین ± انحراف معیار وزنی بیضه (برحسب گرم)در گروهای کنترل، روغن ذرت (p<0/001) و روغن بادام زمینی (p<0/05) ، تفاوت معنی داری بین گروه ها وجود ندارد



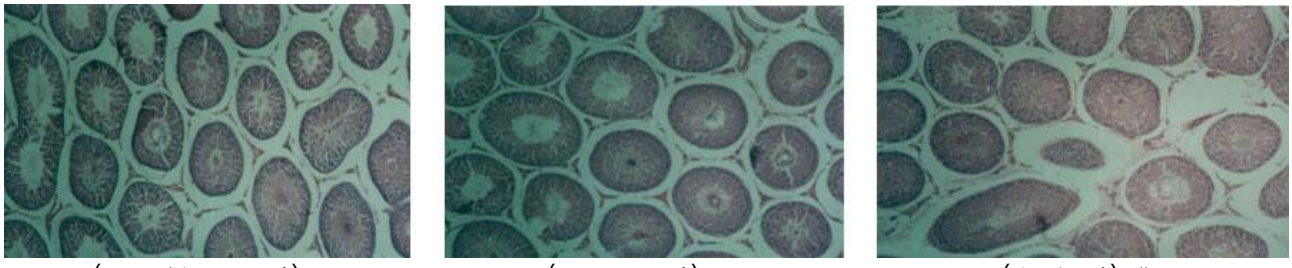
نمودار شماره 3- میانگین± انحراف معیار هورمون FSH (واحد برحسب IU/L) در گروهای کنترل، روغن ذرت (p<0/001) و روغن بادام زمینی (p<0/05) بیانگر تفاوت معنی دارنسبت به گروه کنترل می باشد



نمودار شماره 4- میانگین ± انحراف معیار هورمون LH (واحد برحسب IU/L) در گروهای کنترل روغن ذرت (p<0/001) و روغن بادام زمینی (p<0/05) بیانگر تفاوت معنی دارنسبت به گروه کنترل می باشد

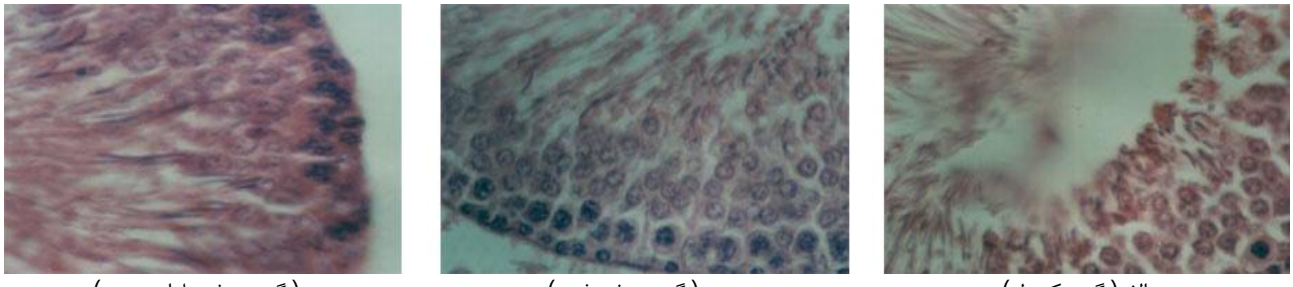


نمودار شماره 5- میانگین ± انحراف معیار هورمون تستسترون (واحد برحسب IU/L) در گروهای کنترل، روغن ذرت (p<0/001) و روغن بادام زمینی (p<0/05) بیانگر تفاوت معنی دارنسبت به گروه کنترل می باشد



الف(گروه کنترل) ب (گروه روغن ذرت) ج (گروه روغن بادام زمینی)

شکل شماره 1- فتومیکروگراف بافت بیضه در گروهای مختلف با بزرگنمایی 4: برش بیضه گروه روغن ذرت و روغن بادام زمینی نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد که لوله‌های سمینیفر زودتر مجرادار شده اند یعنی در واقع از لحاظ بلوغ جنسی جلوتر هستند.



الف(گروه کنترل) ب (گروه روغن ذرت) ج (گروه روغن بادام زمینی)

شکل شماره 2- فتومیکروگراف بافت بیضه در گروهای مختلف با بزرگنمایی 40: اندازه سلول‌های اسپرماتوگنی و اسپرماتوسیت‌ها از کنارهٔ توبول به سمت مرکز در گروههای روغن ذرت و بادام زمینی بزرگ‌تر و رنگ‌پذیرتر هستند و علائمی از حالت ازدیاد سلولی و یا تودهٔ سلولی متراکم را نشان می‌دهند اما در مرکز توبول سلولهای اسپرماتوزوئید کاهش یافته اند. مقایسهٔ برش لولهٔ سمینفر بیضه گروه روغن ذرت و روغن بادام زمینی هم نشان می‌دهد که تراکم سلول در گروه روغن ذرت بیشتر و اندازهٔ سلول‌ها کوچک‌تراست.

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از مشاهدات ماکروسکوپی، مقاطع تهیه شده از بافت بیضه، آزمایشات هورمون شناسی و اندازه گیریهای وزن و حجم بیضه این نظریه را تأیید کرد که تجویز روغن های ذرت و بادام زمینی باعث بلوغ زودرس می گردند. بطوری که در اواسط دورهٔ آزمایش یعنی حدد 30 روز پس از آغاز کار بلوغ جنسی وتمایل جنسی(علایم رفتاری) در گروههای مصرف کنندهٔ روغن ذرت و بادام زمینی کاملاً مشهود بود و بخاطر وجود اسید چرب لینولئیک و آراشیدونیک باعث ازدیاد و تکثیر سلولی در لوله های سیمینیفر شده که در مقاطع میکروگراف تهیه شده دیده می شود اما در ادامه این روغن ها روند اسپرمیوژنز را بطور نسبی متوقف می کنند.

به خوبی می دانیم که، پروستاگلاندینها دارای نقش مهم تنظیمی در واکنش‌های آدنیل سیکلاز در بافتهای مختلف هستد و کنترل انتقال یونها در غشاء سلول را به عهده دارند و با استناد به اینکه گلوکز تنها مادهٔ غذایی است که به مقدار زیاد توسط اپی‌تلیوم زایندهٔ بیضه برای تأمین انرژی این بافت مصرف می‌شود و سلولهای زایندهٔ بیضه برای دریافت گلوکز نیاز مستقیم به انسولین دارند بنابراین اسید آراشیدونیک درروغن بادام زمینی و روغن ذرت عامل افزایش متابولیسم و افزایش فعالیت انسولین در بافت بیضه هستند. با مصرف روغن ذرت و بادام زمینی (به علت داشتن اسید آراشیدونیک) فعالیت انسولین افزایش یافته و مصرف گلوکز در بافت بیضه و بخصوص در سلولهای زایای بیضه افزایش یافته، متابولیسم در این اندام و بافتهای سازنده سلول‌های ویژه(بیضه و مغز) تسریع می‌شود و بلوغ به جلو می افتد(5و6و7و8). بنابراین انتظار می‌رود فعالیتهای طبیعی بیضه قبل از رسیدن حیوان به سن بلوغ آغاز شده و احتمالاً مصرف این روغنها باعث ایجاد تومور در روند اسپرم‌سازی شوند. همچنین مشخص شده است کاهش اسید آراشیدونیک موجب کاهش فعالیت انسولین می گرددکه به نوبه ی خود مصرف گلوکز و متابولیسم را در بافت بیضه کاهش می دهد (9و10و11).

مطالعات گذشته نشان داده اند که پروستاگلندینها به طرق مختلف کاهش‌دهندهٔ فعالیت تولید مثلی و روند اسپرم زایی بیضه هستند و PGE اسپرماتوژنز را در فاز میوتیک کاهش می‌دهد(12و13و14) که این مطلب در مشاهدات میکروسکوپی و تصاویر گرفته شده از لوله های سمنیفر با بزرگنمایی 40 مورد تایید است. در این مقاطع مشاهده می گردد که تراکم و تکثیر بیش از حد سلولی در لایه‌های سلولی لولهٔ سمینیفر ایجاد می‌شود اما درادامه دهانهٔ لوله سمینیفر با کاهش معنی‌داری از تعداد سلول‌های اسپرم مواجه می‌گردد. در مورد مشاهدهٔ وزنی و حجم بیضه‌های گروههای درمان کاملاً مشخص است که وزن و حجم بیضه‌های گروه مصرف کننده روغن ذرت نسبت به گروه مصرف کننده روغن بادام زمینی کنترل کمتر است و این احتمالاً مربوط به کمبود اسید چرب آراشیدونیک روغن ذرت است که این موضوع تأثیر آراشیدونیک اسید را در افزایش متابولیسم و سوخت و ساز را تأیید می‌نماید.

نتایج حاصل از آزمایشات هورمون شناسی نشان داد که میزان هورمون تستوسترون در گروه کنترل بیش از دو گروه دیگر است و این یافته منطبق با مطالعات و آزمایشات قبلی بوده که اظهار داشتند پروستاگلندینها از طریق ممانعت از سنتز استروئیدها در بیضه میزان سطح تستوسترون را در حد معنی‌داری کاهش می‌دهند(15و 16و17). این کاهش تستوسترون در گروههای تغذیه شده با روغن ذرت و بادام زمینی به نوعی می‌تواند موثر در کاهش روند اسپرمیوژنز

باشد(18و19). مقایسه میزان FSH, LH در گروههای کنترل و مصرف کننده ی روغن ذرت و روغن بادام زمینی تفاوت معنی داری را نشان داد؛ بطوری کـه بـاز هـم میـزان FSH, LH در گروه کنترل بیـشتر از گروههـای روغـن ذرت و بـادام زمینـی است ولی این نتایج با مطالعات انجـام شـده قبلـی کـه افـزایش LH در اثر PGE را بیان کـرده انـد مطابقـت نـدارد(20و12). بهرحال با توجه به نقش LH بر روی سلولهای لیدیگ و تولیـد تستوسترون و یافته های این مطالعه بنظر می رسد که کـاهش تستسترون خود می توانید ناشی از کاهش میزان هورمون LH نیز باشد (1).

بنابراین نتیجـه‌گیـری مـی‌شـود، تـأثیر اسـیدهای چـرب ضروری روغن ذرت و بادام زمینی در تولید مثل موش صـحرایی نر بـه گونـه ای اسـت کـه در ابتـدای سـن از شـیرگیری، ایـن ترکیبات عامل تحریک‌کننده و افزایش‌دهندۀ فعالیت سلول‌های زایندۀ لوله های سمینیفر بیضه هستند اما با ادامه مـصرف ایـن مواد با استناد به دلایل ذکر شده عامل ممانعت‌کنندۀ ادامه روند گامت‌زایـی و کـاهش تولیـد اسـپرم در بیـضه مـوش صـحرایی می‌شوند. اگرچه روند اسپرماتوژنز را افزایش می دهند اما تـاثیر منفی بر روی مرحله میوتیک اسـپرماتوژنز و رونـد اسـپرمیوژنز دارند. بنا براین لازم است تحقیقات آینده بر مورفولوژی، میـزان تحرک و باروری اسپرم های حاصـل از تغذیـه بـا روغـن ذرت و روغن بادام زمینـی تمرکـز کننـد و مطالعـات بیـشتری در ایـن زمینـه بایـد انجـام گـردد تـا اثـرات کلـی آنهـا بـر روی رونـد اسپرمیوژنز و اسپرماتوژنز و بطور کلـی بـر روی بـاروری اسـپرم مشخص گردد.

تشکر و قدردانی

از ریاست محترم مرکز گیاهـان دارویـی رازی وابـسته بـه دانـشگاه علـوم پزشـکی لرسـتان و معاونـت محتـرم پژوهـشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان که در انجـام ایـن مطالعـه بـه مـا کمک کردند تشکر و قدر دانی می گردد.

References

1. Hirsc. I.H., Sedor J, Kulp D., Mccue P. J., Staas, W.E. Objective assessment of spermatogenesis in men with functional and anatomic obstruction of the genital tract. International Journal of Anatomy. 2004; 17: 29-34.
2. Ahluwalia B., Pincus Andr G., Holman T. Eessential fatty acid deficiency and its effects upon reproductive organs of male rabbits. Journal nutrition, 1966; 92:205-214.
3. Yuri K. Immuohistochemical and enzyme histochemical localization of peptidergic aminergic and cholinergic nerve fibers in the rat seminal vesicle. J., of urology.1990; 143: 194-198.
4. Pereira, T.A Sinniah, R, Das, N.P., Effect of Dietary palm oil on lipoprotein lipases: lipoprotein levels and Tissue lipids in Rat. Biochemical medicine and metabolic Biology.1990; 44: 207-217.
5. PETERS, A. J. (1992). Sperm antibodies. Am,J, Rep., Imm., 27, 156-162.
6. Gould, M.N. hagg, J.D., Kennan, W.S., Tanner, M.A., Elson, C.E., (1991). A comparison of Tocopherol and Tocotrienol for the chemoprevention of chemically induced Rat Mammary tumors. J. Clin, Nutr. 53. 1068-1070.
7. Nesaretnam K, khor, H. T., Ganeson J., The effect of vitamin E tocotrienols from palm oil on chemically induced Mammary carcinogenesis in female rats. Nut. Res. 1992; 12: 879-892.
8. Yamaoka M, Garrillo M. J. H,. Effect of Tocopherol and tcotrienols on the physiochemical property of the liposomal memberance in Relation to their Antioxidant activity, Chem. Phy . Lipids, 1990; 55: 295-300.
9. Hirsch I.H., Mccue P., Allen J, Lee J, Staas W.E. Quantitative testicular biopsy in spinal cord injured men, comparison to fertile control. J, Urol., (1991); 146 (2):337-410.
10. Hosea, F.S., Huang, L.M., Pogach, E.N., William, G.S Synergistic effects of follicle-stimulating hormone and testosterone on the maintenance of spermiogenesis in hypophysectomized Rates. Endocrinoligy, 1991: 128(6): 3152-3161.
11. Irvin H, Hirsch R.S, Jeyendran J.R.R Biochemical analysis of electro ejaculates in spinal cord injured men: Comparison to normal ejaculates. The Journal of urology, 1991; 135: 73-76.
12. Setchell B.P, Rommerts F.F.G, The importance of leyding Cells in the vascular response hcG in the rat testis. Int. J. Androl. 1985; 8: 436-440.
13. Sharpe. R, Maddocks M. S.. Cell-Cell Interactions in the control of spermatogenesis as studied using leyding cell Destruction and testosterone Replacement. Am. J. of Anatomy. 1990; 188: 3-20.
14. Bergh A.,. Damber J. E, Widmark S, Hormonal control of testicular blood flow, macro circulation and vascular permeability. Molecular and cellular Endocinology of the Testis. B.A Cooke

and R.M. Sharpe, Eds. Seronosysposia, Raven Press. NewYork Vol. 50. 1988; PP: 123-133

15. Coffey D.S, The biochemestery and physiology of the prostate and seminal vesicle. In: Harrison, JH., Campbell's urology,1970. PP: 161-201, WB. Saunders, philadelphia.
16. Corte. G.V, Castaneda G, Blonso R, Arellano, Cervantes C, Parra A. Diurnal Variations' of pituitary and testicular hormones in paraplegic men. Arch. Androl., 1982; 8: 221-230.
17. Wolff H, Poltch J.Z, Martinz A, Haimovici F, Hill J.A, Anderson D.J., Leukocyto spermia associated with poor semen quality. Fertility- sterility, 1990; 53: 528-536.
18. Glass A.E, Anderson J, Herbert D. Sexual maturation in under fed weight matched rats. J. Andro., 1987; 8: 116-122.
19. Turner T.T, Ewing L.L, Jones C.E, Howards S.S, Zegeye B. Androgen in various fluid compartments of the rat testis and epididymis after hypophysectomy and gonadotropin supplementation. J., Androl., 1985;6: 353-362.
20. Glover T.D, Yong D.H. Temperature and production of spermatozoa. Fertility - sterility, 1963; 14: 44-4502.