

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

میرزا علی نظری نیا<sup>1,3</sup>، مسعود علیرضایی<sup>2,1</sup>، محمد بلوچ<sup>3</sup>، علی حائری روحانی<sup>3</sup>، شیما نعمتی<sup>1</sup>

1- مرکز تحقیقات 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

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

○ 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 گروه های 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.

○ یافته ها: نتایج نشان داد که کاهش معنی داری در میزان هورمون تستسترون و FSH در گروه های 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 گروه های درمان نسبت به کنترل مشاهده گردید اما این تفاوت معنی دار نبود.

○ بحث و نتیجه گیری: در مجموع مطالعه حاضر نشان میدهد که مصرف روغن ذرت و بادام زمینی احتمالاً "بخاطر وجود اسیدهای چرب غیر اشباع بویژه آراشیدونیک اسید که به نوبه خود پیش ساز پروستا گلندین ها می باشد می توانند با تاثیر 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.

○ واژه های کلیدی: روغن ذرت، روغن بادام زمینی، اسپرماتوژنز، موش صحرایی

آدرس مکاتبه: خرم آباد، دانشگاه لرستان، آموزشکده دامپزشکی، بخش بیوشیمی

پست الکترونیک: [Alirezaei\\_m54@yahoo.com](mailto: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 نئوپلاستیکی، 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 دانه‌های 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 دهیبرتری در موش صحرایی این نتیجه را بیان داشته‌اند 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 می‌رسد که اثرات اسید آراشیدونیک و لینولئیک بصورت توأم بر فعالیت تولید مثلی (مرحله میوتیک اسپرماتوژنز) همراه با آزمایشات اندازه‌گیری حجم و وزن بیضه‌ها و مطالعه میکروسکوپی مقاطع بافتی و آزمایشات هورمون‌شناسی 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 روش‌ها

الکل مطلق، تولوئن، فرمالین، اسید پیکریک، اسید استیک، اسید سیتریک، همتوکسیلین 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

فیزیولوژی شستشو داده شد و وزن (ترازوی با دقت گرم 0,0001) و حجم بیضه ها (با استفاده از استوانه مدرج) اندازه گیری شد (نمودار 1 و 2). 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 آلومین با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اُئوزین رنگ گرفتند. و مشاهده میکروسکوپی و تفسیر لامها با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی 40 و 40 انجام شد (شکل 1 و 2).

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.

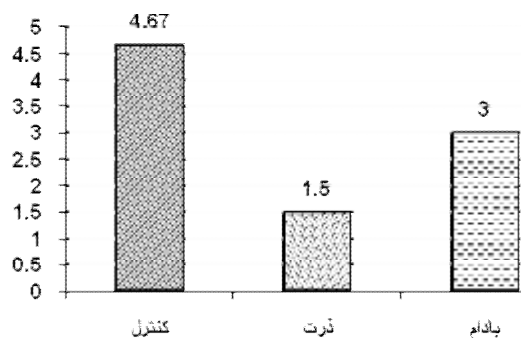
### یافته ها

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 1 و 2). 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 هر سه گروه بیانگر وجود تفاوت معنی دار بین دو گروه درمان نسبت به گروه کنترل می باشد (نمودار 4) در حالیکه اندازه گیری سطح هورمون تستسترون بیانگر تفاوت معنی دار دو گروه درمان نسبت به کنترل می باشد ( $P < 0,001$ ).

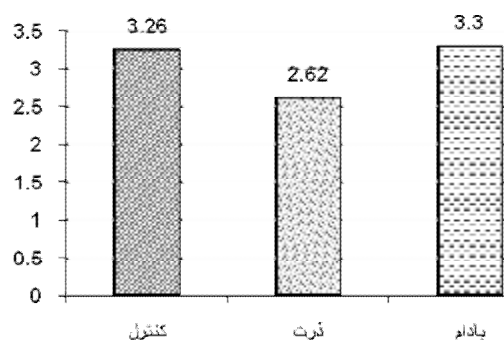
شده دما  $20 \pm 2$  درجه سانتیگراد و دوره نوری 12 ساعت تاریکی و 12 ساعت روشنایی با دسترسی آزاد به آب و پلت تهیه شده از کارخانه دانه پارس دام استفاده گردید و بخش ملاحظات اخلاقی به تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی لرستان رسید.

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 بر استفاده از غذای آزمایشگاهی به میزان 10 درصد غذای روزانه روغن بادام زمینی استفاده و گروه ذرت بعنوان گروه روغن ذرت، علاوه بر استفاده 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 می شد. 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 بیضه آنها کاملاً مشخص و در کیسه اسکروتوم در قسمت عقب بدن قابل مشاهده بود. پس از سه ماهگی موشها با اتر بی هوش شدند و موشها را به پشت خوابانده و از زیر قلب آن توسط سرنگ انسولینی خون گیری 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.

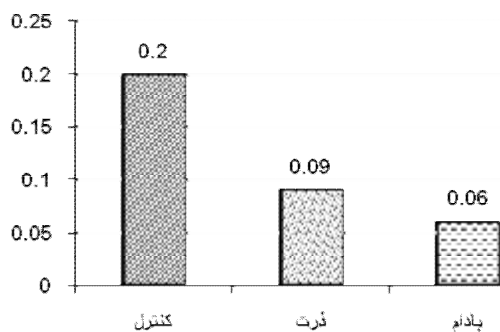
برای خارج کردن بیضه ها، با استفاده از قیچی و گیره مخصوص آنها را از جلوی اپیدیدیم برش داده و سپس از داخل پرده آلبوژینه مجزا کرده و بیضه‌ها بلافاصله در داخل سرم



نمودار شماره 1- میانگین  $\pm$  انحراف معیار حجمی بیضه (برحسب سانتیمتر مکعب) در گروه‌های کنترل، روغن ذرت ( $p < 0/001$ ) و روغن بادام زمینی ( $p < 0/05$ ) بیانگر تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل می باشد



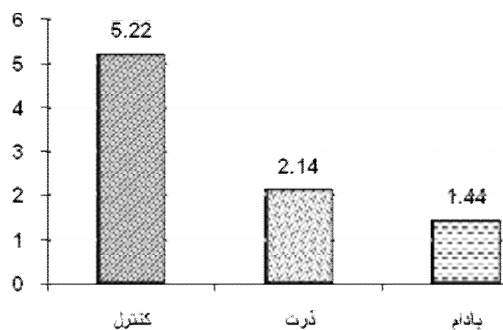
نمودار شماره 2- میانگین  $\pm$  انحراف معیار وزنی بیضه (برحسب گرم) در گروه‌های کنترل، روغن ذرت ( $p < 0/001$ ) و روغن بادام زمینی ( $p < 0/05$ ) ، تفاوت معنی داری بین گروه ها وجود ندارد



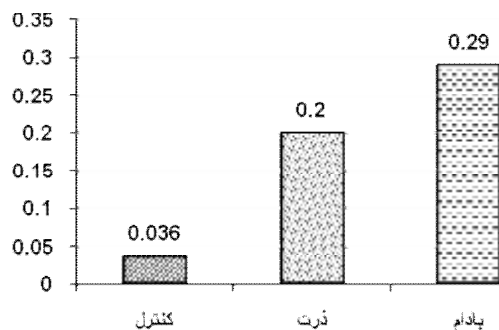
نمودار شماره 3- میانگین  $\pm$  انحراف معیار هورمون FSH (واحد برحسب IU/L) در گروه‌های کنترل، روغن ذرت ( $p < 0/001$ ) و روغن بادام زمینی ( $p < 0/05$ ) بیانگر تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل می باشد

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 می دهد که اندازه سلول های اسپرماتوگنی و اسپرماتوسیت ها از کناره توبول به سمت مرکز در گروههای درمان بزرگ تر و رنگ پذیرتر نسبت به گروه کنترل هستند. در برش بافتی لوله سمینفر بیضه گروه روغن ذرت و گروه روغن بادام زمینی تراکم سلول ها در قسمت کنار لوله سمینفر بیشتر از مرکز لوله که اسپرماتوزوا هستند بوده و در جدار لوله فضای بین سلولی کمتری مشاهده می شود و علائمی از حالت ازدیاد سلولی و یا توده سلولی متراکم را نشان می دهد اما مقایسه برش لوله بیضه گروه روغن ذرت و بادام زمینی در مرکز لوله سمینفر با گروه کنترل نشان می دهد که تراکم اسپرماتوزوا در گروه کنترل بیشتر و این بیانگر توقف مرحله اسپرمیوژنز در گروههای درمان است (شکل 2).

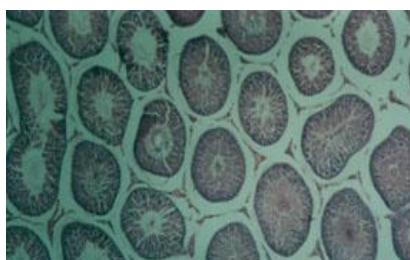
بیضه در گروههای مختلف با بزرگنمایی 40: اندازه سلول های اسپرماتوگنی و اسپرماتوسیت ها از کناره توبول به سمت مرکز در گروههای روغن ذرت و بادام زمینی بزرگ تر و رنگ پذیرتر هستند و علائمی از حالت ازدیاد سلولی و یا توده سلولی متراکم را نشان می دهند اما در مرکز توبول سلولهای اسپرماتوزوئید کاهش یافته اند. مقایسه برش لوله سمینفر بیضه گروه روغن ذرت و روغن بادام زمینی هم نشان می دهد که تراکم سلول در گروه روغن ذرت بیشتر و اندازه سلول ها کوچک تر است.



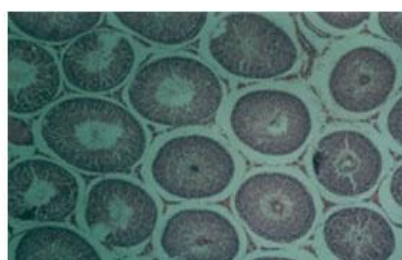
نمودار شماره 5- میانگین  $\pm$  انحراف معیار هورمون تستسترون (واحد بر حسب IU/L) در گروه‌های کنترل، روغن ذرت ( $p < 0/001$ ) و روغن بادام زمینی ( $p < 0/05$ ) بیانگر تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل می باشد



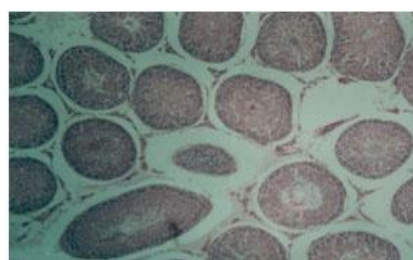
نمودار شماره 4- میانگین  $\pm$  انحراف معیار هورمون LH (واحد بر حسب IU/L) در گروه‌های کنترل روغن ذرت ( $p < 0/001$ ) و روغن بادام زمینی ( $p < 0/05$ ) بیانگر تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل می باشد



ج (گروه روغن بادام زمینی)

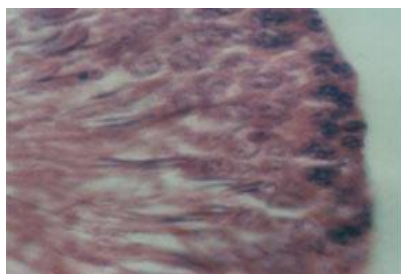


ب (گروه روغن ذرت)

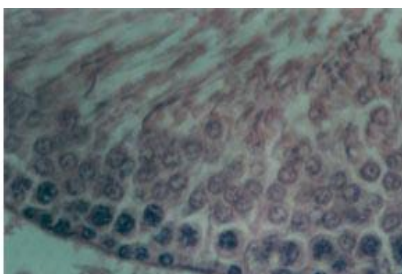


الف (گروه کنترل)

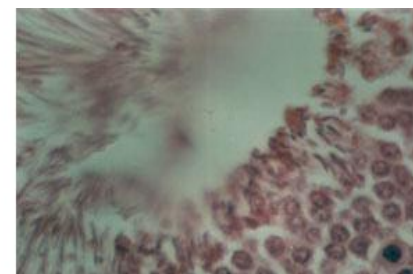
شکل شماره 1- فتومیکروگراف بافت بیضه در گروه‌های مختلف با بزرگنمایی 4: برش بیضه گروه روغن ذرت و روغن بادام زمینی نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد که لوله‌های سمینفر زودتر مجرا دار شده اند یعنی در واقع از لحاظ بلوغ جنسی جلوتر هستند.



ج (گروه روغن بادام زمینی)



ب (گروه روغن ذرت)



الف (گروه کنترل)

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

## 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 دوره آزمایش یعنی حدود 30 روز پس از آغاز کار بلوغ جنسی و تمایل جنسی (علایم رفتاری) در گروههای مصرف کننده روغن ذرت و بادام زمینی کاملاً مشهود بود و بخاطر وجود اسید چرب لینولئیک و آراشیدونیک باعث ازدیاد و تکثیر سلولی در لوله های سیمینفر 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، پروستاگلندینها دارای نقش مهم تنظیمی در واکنش های آدنیل سیکلاز در بافتهای مختلف هستند و کنترل انتقال یونها در غشاء سلول را به عهده دارند و با استناد به اینکه گلوکز تنها ماده غذایی است که به مقدار زیاد توسط اپی تلیوم زاینده بیضه برای تأمین انرژی این بافت مصرف می شود و سلولهای زاینده بیضه برای دریافت گلوکز نیاز مستقیم به انسولین دارند بنابراین اسید آراشیدونیک در روغن 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 سلول های ویژه (بیضه و مغز) تسریع می شود و بلوغ به جلو می افتد (5و6و7و8). بنابراین انتظار می رود فعالیت های طبیعی بیضه قبل از رسیدن حیوان به سن بلوغ آغاز شده و احتمالاً مصرف این روغن ها باعث ایجاد تومور در روند

اسپرم سازی شوند. همچنین مشخص شده است کاهش اسید آراشیدونیک موجب کاهش فعالیت انسولین می گردد که 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 کاهش دهنده فعالیت تولید مثلی و روند اسپرم زایی بیضه هستند و PGE اسپرماتوژنز را در فاز میوتیک کاهش می دهد (12و13و14) که این مطلب در مشاهدات میکروسکوپی و تصاویر گرفته شده از لوله های سمنیفر با بزرگنمایی 40 مورد تأیید است. در این مقاطع مشاهده می گردد که تراکم و تکثیر بیش از حد سلولی در لایه های سلولی لوله سمنیفر ایجاد می شود اما در ادامه دهانه لوله سمنیفر با کاهش معنی داری از تعداد سلول های اسپرم مواجه می گردد. در مورد مشاهده وزنی و حجم بیضه های گروههای درمان کاملاً مشخص است که وزن و حجم بیضه های 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 می نماید.

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 معنی داری کاهش می دهند (15و16و17). این کاهش تستوسترون در گروههای تغذیه شده با روغن ذرت و بادام زمینی به نوعی می تواند موثر در کاهش روند اسپرمیوژنز

باشد (18 و 19). مقایسه میزان FSH, LH در گروههای کنترل و مصرف کننده ی روغن ذرت و روغن بادام زمینی تفاوت معنی داری را نشان داد؛ بطوری که باز هم میزان FSH, LH در گروه کنترل بیشتر از گروههای روغن ذرت و بادام زمینی است ولی این نتایج با مطالعات انجام شده قبلی که افزایش LH در اثر PGE را بیان کرده اند مطابقت ندارد (20 و 12). بهر حال با توجه به نقش LH بر روی سلولهای لیدیگ و تولید تستوسترون و یافته های این مطالعه بنظر می رسد که کاهش تستسترون خود می توانید ناشی از کاهش میزان هورمون LH نیز باشد (1).

بنابراین نتیجه گیری می شود، تأثیر اسیدهای چرب ضروری روغن ذرت و بادام زمینی در تولید مثل موش صحرایی نر به گونه ای است که در ابتدای سن از شیرگیری، این ترکیبات عامل تحریک کننده و افزایش دهنده فعالیت سلولهای زاینده لوله های سمینیفر بیضه هستند اما با ادامه مصرف این

مواد با استناد به دلایل ذکر شده عامل ممانعت کننده ادامه روند گامت زایی و کاهش تولید اسپرم در بیضه موش صحرایی می شوند. اگرچه روند اسپرماتوژنز را افزایش می دهند اما تأثیر منفی بر روی مرحله میوتیک اسپرماتوژنز و روند اسپرمیوژنز دارند. بنا براین لازم است تحقیقات آینده بر مورفولوژی، میزان تحرک و باروری اسپرم های حاصل از تغذیه با روغن ذرت و روغن بادام زمینی تمرکز کنند و مطالعات بیشتری در این زمینه باید انجام گردد تا اثرات کلی آنها بر روی روند اسپرمیوژنز و اسپرماتوژنز و بطور کلی بر روی باروری اسپرم مشخص گردد.

### تشکر و قدردانی

از ریاست محترم مرکز گیاهان دارویی رازی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی لرستان و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان که در انجام این مطالعه به ما کمک کردند تشکر و قدر دانی می گردد.

## References

- Hirsch 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.
- Ahluwalia B., Pincus Andr G., Holman T. Essential fatty acid deficiency and its effects upon reproductive organs of male rabbits. *Journal nutrition*, 1966; 92:205-214.
- Yuri K. Immunohistochemical and enzyme histochemical localization of peptidergic aminergic and cholinergic nerve fibers in the rat seminal vesicle. *J. of urology*.1990; 143: 194-198.
- 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.
- PETERS, A. J. (1992). Sperm antibodies. *Am,J, Rep., Imm.*, 27, 156-162.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. *Endocrinology*, 1991: 128(6): 3152-3161.
- 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.
- 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.
- 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.
- Bergh A., Damber J. E, Widmark S, Hormonal control of testicular blood flow, macro circulation and vascular permeability. *Molecular and cellular Endocrinology of the Testis.* B.A Cooke

- and R.M. Sharpe, Eds. Seronosyposia, 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.