جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بررسی اثر برگ پنیرک (*Malva sylvestris*) بر اسپرم و مراحل اسپرماتوژنز در موش نژاد C-57

زهرا نوحی زاده، کاظم پریور*، نسیم حیاتی رودباری

گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات:kazem_parivar@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۸

چکیده

تا کنون مطالعات متعددی در زمینه گیاه دارویی هزار ساله پنیرک (*Malva sylvestris*) انجام شده است. گیاه پنیرک علفی و پایا از تیره Malvaceae و مخصوص نواحی پر آب می‌باشد. در طب سنتی برای درمان سرفه، درد معده و گلو استفاده می‌شود. اجزا مهم آن اسیدهای چرب، آنتی‌اکسیدانت‌ها، فلاونوئیدها، ویتامین‌ها، ترپن‌ها و مواد معدنی هستند. چون انواع آنتی‌اکسیدانت‌ها به مقدارکم در سیتوپلاسم اسپرم و به مقدار بیشتر در مایع اسپرمی وجود دارد، از اسپرم در برابر استرس اکسیداتیو (OS) در اثر غلظت‌های زیاد مشتقات فعال اکسیژن (ROS) و پراکسیداسیون چربی‌ها (LPO) محافظت می‌کنند و این ظرفیت آنتی‌اکسیدانی طبیعی در افراد نابارور بسیار کم می‌باشد. هدف از این تحقیق بررسی اثرات عصاره برگ پنیرک بر اسپرم و مراحل اسپرماتوژنز می‌باشد. در این مطالعه تعداد ۱۲ سر موش نژاد c-57 نر بالغ انتخاب شدند. وزن موش‌ها حدود ۳۵-۳۰ گرم بود و به دو گروه شش‌تایی تقسیم شدند. موش‌ها به دو گروه تقسیم شدند گروه تجربی گاواژ شده با عصاره هیدروالکلی برگ پنیرک با غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و گروه کنترل که آب غیریونیزه شده را دریافت می‌کرد. گاواژ به مدت ۱۴روز، هر روز با سوزن گاواژ بصورت خوراکی داده شد. روز ۱۵ موش‌ها تشریح و بیضه‌ها استخراج و پس از مراحل پاتولوژی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که مورفولوژی سلول‌ها تغییرکرده و تعداد سلول‌های اسپرماتسیت اولیه و اسپرم ($P<0.01$) افزایش معنی-داری پیدا کرده است.

کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدانت، اسپرماتوژنز، پنیرک، *Malva sylvestris*

مقدمه

گیاه پنیرک با نام علمی *Malva sylvestris* گیاهی خودرو و مخصوص نواحی پر آب می باشد. برگ، گل، ریشه و حتی گیاه کامل قسمت‌های مورد استفاده برای حصول فرآورده‌های گیاهی پنیرک است.پنیرک، گیاه علفی و پایا یا دو ساله است که بلندی آن به ۸۰ سانتی‌متر می‌رسد. این گیاه دارای برگ‌های متناوب با دمبرگ‌های دراز و ۵ تا ۷ لوب دندانه‌دار، ساقه‌ای راست، استوانه‌ای و کرک‌دار، ریشه‌ای گوشتی، سفید رنگ و با قوام، گل‌هایی با رنگ گلی مایل به بنفش و با خطوط تیره، و میوه‌های کپسولی مدور است. برای بدست آوردن بیشترین ماده موثره که عامل اصلی بروز خواص دارویی- درمانی است، باید به زمان مناسب جمع آوری هر یک از قسمت‌های گیاه توجه داشت. بطوری‌که در ارتباط با گیاه پنیرک، بهتر است تا گل‌ها در دوران شکوفه بودن یعنی در اواخر بهار و تا اوایل تابستان، قبل از اینکه شکفته شوند، چیده و در سایه خشک شوند، ریشه در پاییز از خاک بیرون کشیده شود و پس از شست و شو خشک گردد، و برگ‌ها نیز در فصل بهار به‌ویژه در ماه خرداد برداشت و در سایه خشک شوند. ترکیب تقریبی برگ پنیرک حاوی حدود ۸ درصد موسیلاژ می باشد که پس از هیدرولیز، تولید قندهای آرابینوز، گلوکز، رامنوز، گالاکتوز و اسید گالاکتورونیک اسید می‌کند. همچنین حاوی مقدار تانن و فلاونوئید است. فعالیت بیولوژیکی برگ این گیاه وابسته

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

به آنتی‌اکسیدانت‌ها، پلی فنول‌ها، ویتامین C، ویتامین E، بتا کاروتن و مواد شیمیایی مهم دیگر آن می‌باشد [۳، ۲۷]. با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی و مقدار قابل توجه میزان ویتامین C و E موجود در برگ این گیاه، اثرات آن بر اسپرم و مراحل اسپرماتوژنز مورد بررسی قرار گرفت. مجموعه متابولیت‌های اکسیژن با نام انواع اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species, ROS) بعنوان یکی از عوامل ایجاد ناباروری یا عقیمی در انسان مطرح می‌باشند [۲۶]. Ros در دو مسیر مخالف بر عملکرد و ساختار سلول‌های اسپرم تأثیر دارد، از یکسو جهت انجام برخی روندهای طبیعی اسپرم نظیر واکنش آکروزومی ضروری است و ازسوی دیگر در غلظت‌های افزایش یابنده خود در محیط که موسوم به استرس اکسیداتیو (Oxidative Stress, OS) است، موجب مهار و نیز تغییر در شکل (Motility) قدرت تحرک ظاهری سلول‌های اسپرم می‌گردد و در نهایت منجر به عقیمی یک فرد می‌شود [۹، ۱۰، ۱۱]. در شرایط طبیعی به منظور جمع‌آوری و سپس خنثی سازی Ros، در داخل و خارج سلول، آنتی‌اکسیدان‌ها وارد عمل می‌شوند. سلول‌های اسپرم در طی روند اسپرماتوژنز، مقدار زیادی از سیتوپلاسم خود را همراه مواد آنتی اکسیدانی موجود در آن از دست داده و بدین ترتیب در مقابل روند OS حساس می‌گردند، اما به علت غوطه وری در مایع اسپرمی که محتوی آنتی-اکسیدان‌های فراوانی است، به خوبی در مقابل روند OS محافظت می‌گردند [۴]. در سال‌های اخیر نیز ثابت شده است که در پلاسمای مایع اسپرمی مردان نابارور مقدار کمتری از انواع آنتی‌اکسیدان‌ها در مقایسه با مردان بارور وجود دارد [۱۵، ۲۰، ۲۶]. سلول‌های اسپرم به علت دارا بودن مقادیر زیادی از اسیدهای چرب غیراشباع در غشاء، برای دریافت OS بسیار مستعد می‌باشند و بدین ترتیب واحدهای چربی (در غشاء سلول و غشاء اندامک‌ها) به راحتی دچار اکسیداسیونی موسوم به پراکسیداسیون چربی‌ها (Lipid Peroxidation, LPO) می‌شود که با عملکرد آنتی‌اکسیدان‌ها تعدیل و یا خنثی می‌گردد. روند LPO موجب تخریب ساختار غشاء، کاهش قدرت تحرک، مهار فعالیت‌های آنزیمی و ایجاد شکستگی در DNA سلول‌های اسپرم شده، و لذا بعنوان یکی از عوامل مهم بروز ناباروری در مردان مطرح است [۹، ۱۱، ۱۲، ۲۱، ۲۶]. اسپرماتوژنز فرآیندست پیوسته که در آن سلول‌های اسپرماتوگونی از لوله‌های منی‌ساز عبور کرده و به ترتیب به اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید کروی و طویل شده تمایز می‌یابند که ۷۵-۷۰ روز طول می‌کشد [۲۳]. اسپرماتوژنز را می‌توان به سه فاز اصلی تقسیم کرد:۱- اسپرماتوسیتوژنز: شامل یکسری تقسیمات میتوزی است که موجب تبدیل اسپرماتوگونی به اسپرماتوسیت اولیه می‌شود. ۲ـ میوز: شامل دو تقسیم متوالی است: در تقسیم اول کاهش کروموزومی اتفاق می‌افتد و اسپرماتوسیت‌های ثانویه حاصل می‌شود. در تقسیم دوم از هر اسپرماتوسیت ثانویه دو اسپرماتید به وجود می آید.۳-اسپرمیوژنز: اسپرماتیدهای گرد و کوچک دچار متامورفوز شده و به صورت سلولی با سر کوچک و دمی دراز به نام اسپرماتوزوئید تغییر شکل می‌دهند. این مرحله شامل ۴ فاز می‌باشد: فاز گلژی، فاز کلاهکی، فاز آکروزومی و فاز بلوغ [۱۷، ۱۸، ۲۲]. اپیتلیوم لوله‌های منی‌ساز دارای دو دسته سلول متفاوت است: سلول‌های منی‌ساز و سلول‌های تغذیه کننده یا پشتیبان به نام سرتولی [۶].

هدف از این تحقیق بررسی اثرات عصاره برگ پنیرک بر اسپرم و مراحل اسپرماتوژنز می باشد که برای اولین بار انجام می‌شود.

مواد و روش کار

در این تجربیات از موش سیاه آزمایشگاهی نژاد c-57 به عنوان حیوان مورد آزمایش استفاده شد. ابتدا موش‌های نر را از انیستیتو پاستور تهران خریداری نموده و به اتاق نگهداری حیوانات جهاد دانشگاهی قم منتقل گشتند. در این

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

آزمایشات از ۱۲ سر موش بالغ نژاد c-57 با وزن تقریبی ۳۰ تا ۳۵ گرم استفاده شد. پس از گذشت یک هفته از خریداری موش‌ها، موش‌های هم‌وزن شناسایی شده و در ۲ قفس تقسیم شده و برای انجام آزمایشات آماده گشتند. موش‌ها در ۲ گروه تحت عنوان: کنترل (فقط آب شهری غیریونیزه شده دریافت کردند) تجربی (با دریافت غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم عصاره برگ پنیرک بر کیلوگرم وزن موش به همراه حلال آب شهری غیریونیزه شده) تقسیم بندی شدند.

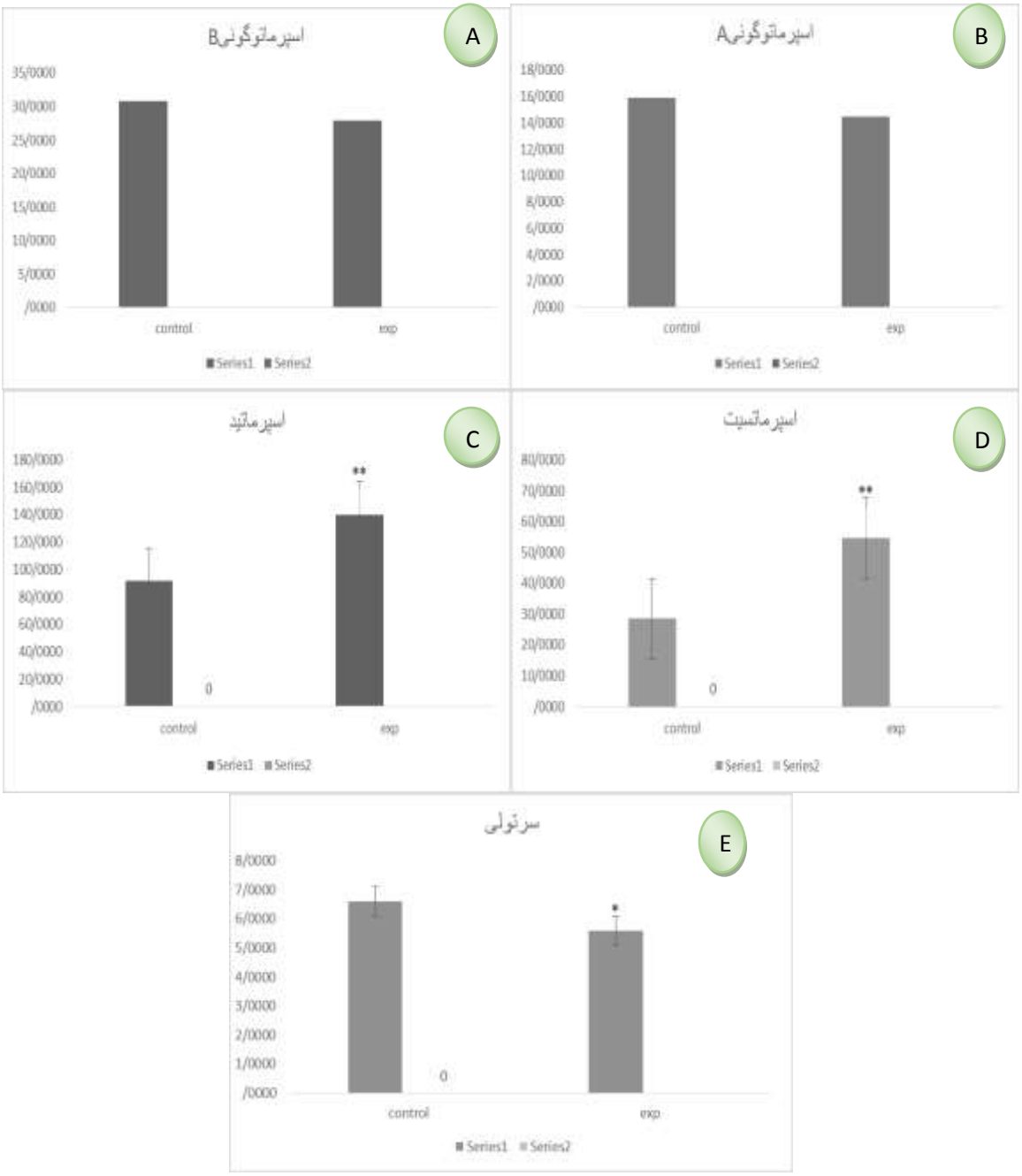
نحوه آماده کردن گیاه و گاواژ آن به موش‌ها: برگ پنیرک از استان قم در اردیبهشت سال ۱۳۹۲ تهیه گردید. خشک کردن عبارت است از: کاهش مقدار رطوبت در اندام‌های جمع‌آوری شده، به طوریکه بتوان بدون هیچ خطری آنها را برای مدتی نگهداری نمود. به طور کلی در خشک کردن گیاهان دارویی سه عامل مهم و اساسی همواره باید مد نظر باشد. نخست عدم تغییر در میزان ماده موثره موجود در گیاهان، دوم عدم تغییر در صفات خارجی نظیر رنگ و بو و طعم ... و سوم عدم تاثیر نامطلوب اقتصادی بر محصول. گیاهان دارویی باید پس از خشک شدن حدود ۱۰تا ۱۴٪ رطوبت باقی داشته باشند. رطوبت کمتر از حد ذکر شده (خشک شدن شدید گیاه)، نه تنها باعث کاهش اثر دارویی مواد موثره گیاه می‌شود. بلکه داشتن چنین داروهایی از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه نخواهد بود. مقدار بیش از حد رطوبت نیز احتمال کپک زدن گیاهان و عوارض طبیعی دیگری در آنها افزایش می دهد. پس از تهیه و خشک شدن آنرا پودر کرده و بعد با دستگاه عصاره‌گیری و روش سوکسله (حلال الکل۸۰٪) هرکدام بصورت مستقل عصاره-گیری شده و بعد مراحل خشک کردن (روتاری و خشک شدن در محیط آزمایشگاه) اعمال شد. سپس عصاره خشک شده با آب شهری غیریونیزه شده مخلوط و با هیتر کاملا حل شد. در نتیجه عصاره‌گیری به طریق خیساندن در الکل از هر۱۰۰ گرم پودر برگ پنیرک، ۸ گرم پودر خشک عصاره بدست آمد. عصاره با غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وسط سوزن گاواژ به موش‌های ۳۵-۳۰ گرمی گروه‌های مورد مطالعه به مدت ۱۴ روز بصورت خوراکی داده شد. با رعایت اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی، بافت بیضه از موش‌ها استخراج گردید. بدین ترتیب که پس از بیهوش کردن حیوان باکلروفرم و شکافتن سطح شکمی توسط محلول بتادین جراحی و الکل ۷۰ درصد عفونی گردید و بیضه‌ها خارج گردید و با محلول سرم فیزیولوژیک شسته و برای آماده‌سازی جهت دیگر مراحل در فرمالین ۱۰ درصد قرارداده شد وبه روش هماتوکسیلین- ائوزین رنگ-آمیزی و در زیر میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفت. برای مشاهده و بررسی سلول‌ها، از میکروسکوپ اینورت (LEICA آلمان) و توسط دوربین دیجیتال متصل به میکروسکوپ (INFINITYI کانادا) با بزرگنمایی‌های مختلف عکسبرداری شد. جهت شمارش سلول‌ها در هر برش، ۱۰ لوله سمینیفر با لنز شیئی ۱۰x به صورت تصادفی انتخاب، و تعداد سلول‌ها در هر میدان شمارش شد و این کار برای هر ۶ نمونه تکرار شد.

تجزیه و تحلیل آماری: اطلاعات بدست آمده توسط روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون Tukey مورد مقایسه قرار گرفته و سطح معنی‌داری در حد P< ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. آنالیز آماری با استفاده از برنامه نرم افزاریSPSS انجام پذیرفت.

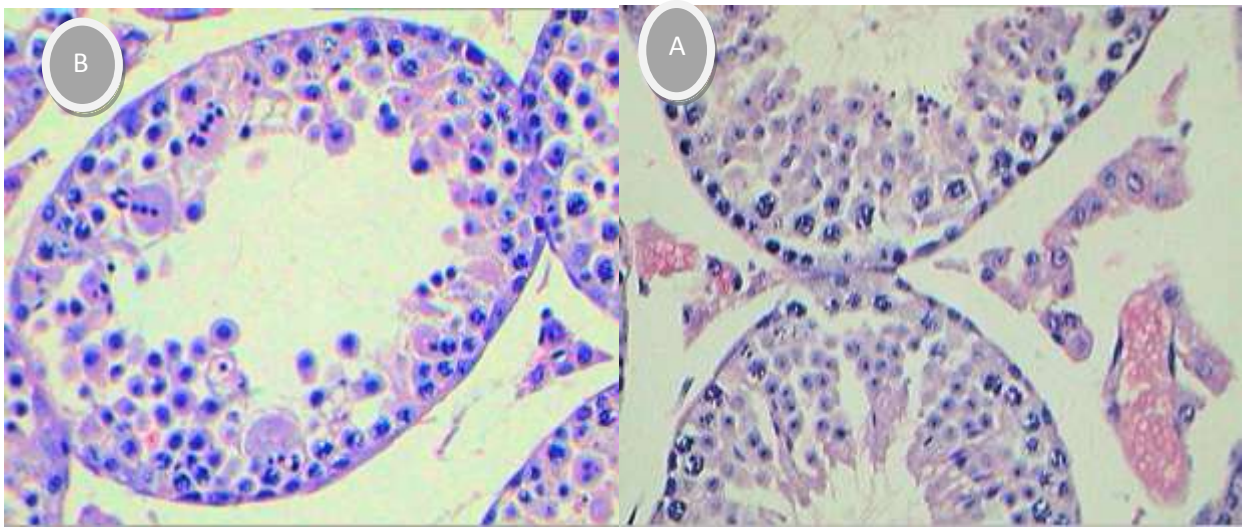
نتایج

بررسی پارامترهای مورفومتریک در بیضه‌ها نشان داد که میانگین اسپرماتوگونی‌ها افزایش معنی‌داری نشان نداد ولی میانگین اسپرماتسیت در گروه تجربی نسبت به کنترل (p<0.01) و اسپرماتید در گروه تجربی (P<0.01) افزایش و میانگین سرتولی (P<0.01) کاهش معنی‌داری نشان داد (نمودار۱) و کلنی‌های غیرطبیعی اسپرماتید و بی‌نظمی در

اسپرماتوژنز گروه تجربی گاواژ شده بـا بـرگ مشـاهده شـد (شکلB۱).



نمودار ۱ـ مقایسه‌ی اسپرماتوگونی a (A)، اسپرماتوگونی b (B)، اسپرماتسیت، (C)، اسپرماتید(D)، سرتولی(E)، در گروه‌های کنترل و تجربی (M ± SE) (*P< 0.05 ,** P< 0.01 ,*** P < 0.001)



شکل ۱ـ فتومیکروگراف مقطع بیضه بالغ A) گروه کنترل، B) گروه تجربی (برگ با دوز توسط ۴۵ میلی‌گرم)

بحث

طبق کتب قدیمی طب سنتی این احتمال می‌رود که استفاده از گیاهان دارویی باعث افزایش باروری و در رفع مواردی از قبیل عدم تعادل هورمونی، ناتوانی جنسی (ضعف جنسی) تعداد کم اسپرم، حرکت کند اسپرم، التهاب پروستات، واریکوسل و... می‌تواند تاثیر مثبت داشته باشد [۱۶]. برخی از گیاهان که می توانند در تحریک قوای جنسی موثر واقع شوند: عبارتنداز شنبلیله، زنجبیل، گزنه، تمشک، موز، گل کلم، پیاز، فلفل قرمز و سبز، تخم کدو، کاسنی سالادی، شیرین بیان، خارخسک، سیر و دارچین [۵، ۸]. یکی از علل مهم ناباروری در مردان وجود رادیکال‌های آزاد در مایع سمینال می‌باشد که باعث اکسیداسیون DNA اسپرم و تغییر بازهای آلی در ساختمان DNA می‌گردد و در نهایت موجب تخریب اسپرم یا کاهش قدرت حرکتی و باروری می‌شود [۲]. مطالعات اولرو و همکاران نشان داده که بین کاهش ظرفیت تام آنتی‌اکسیدان (TAC) پلاسمای سمینال با کاهش کیفیت اسپرم ارتباط نزدیکی وجود دارد و به علت تولید بیش از حد Ros آسیب ایجاد شده در غشای اسپرم منجر به کاهش تحرک اسپرم، غیرفعال شدن آنزیم‌های گلیکولیتیک و آسیب غشای آکرزومی، اکسیدشدن DNA و در نهایت باعث ناتوانی اسپرم در باروری تخمک و ایجاد یک حاملگی مؤثر می‌شود [۱۴]. هندین و همکاران نشان دادند افزایش سطح Ros و کاهش سطح تام آنتی‌اکسیدان، در ایجاد ناباروری درافراد مبتلا به واریکوسل موثراست. این افزایش با اختلال در عملکرد اسپرم و ناباروری مرتبط بود که معمولا در این بیماران دیده می‌شود [۱۹] در سال ۱۹۹۴ گروهی از محققین عنوان نمودند که افزودن یک آنتی-اکسیدان به اسپرم‌های حاصل از سانتریفوژ مایع اسپرمی، موجب کاهش صدمات سلولی ناشی از اجراء این روش بر آنان می‌گردد. در راس این صدمات پراکسیداسیون چربی‌ها (LPO) قرار دارد که خود ناشی از افزایش غیرطبیعی میزانRos در محیط است [۷]. نتایج پژوهش حاضر نشان داد میانگین اسپرماتوگونی‌ها و سلول‌های سرتولی اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های تحت مطالعه نداشته ولی اسپرماتسیت اولیه و اسپرماتید و اسپرم در گروه تجربی۱و۲ در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشته که این افزایش می‌تواند به دلیل استفاده از گل و برگ پنیرک که

محتوی آنتی‌اکسیدانی معادل ترولوکس است باشد [۱۵] Kavashima و Valente soares نشان دادند که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برگ پنیرک بیشتر از برگ اسفناج بود [۲۷] و این نتایج با افزایش اسپرماتوژنز در این مطالعه اثبات شد. اجزاء برگ پنیرک حاوی آنتی‌اکسیدان‌ها و اسیدهای چرب و مواد معدنی و لعاب میباشد. در این مطالعه آنتی‌اکسیدان‌ها (فلاونوئیدها، ویتامین C و E به نوبه خود باعث افزایش اسپرماتوژنز و اسپرم شدند استخراج متانولی برگ و برگچه-های پنیرک نشان داد که آنها دارای ۸۲٪ اسیدهای چرب اسید لینولنیک و لینولیک و پالمتیک بوده که عمده آنها ۲-متوکسی-۴-وینیل فنول بود می‌باشد [۲۷]. در سال ۱۹۹۵ در یک آزمایش نشان داده شد که کاربرد ترولوکس در نمونه-های اسپرم بز تیمار یافته با محرک LPO موجب کاهش معنی‌داری (۶۲ ٪) در تولید محصولات نهایی LPO می‌شود [۱۴]. استرس اکسیداتیو یکی از فاکتورهایی است که بر پتانسیل باروری اسپرماتوزوآ از طریق پراکسیداسیون لیپیدها اثر می‌گذارد که ممکن است به غیرعملکردی شدن اسپرم منجر شود [۱۳] که باتوجه به این آزمایش مشاهده کلنی‌های غیرطبیعی درروند تولید اسپرم دور از انتظار نبود.

نتیجه‌گیری

در نهایت می‌توان گفت با توجه به اهمیت آنتی‌اکسیدان‌ها در اسپرماتوژنز و تاثیرآن درافزایش معنی‌دار فاکتورهای اسپرماتوژنز در گروه تجربی احتمال تاثیر مثبت این داروی گیاهی در تولید اسپرم و توان تولیدمثلی نر وجود دارد، گرچه برای کسب نتایج دقیق‌تر احتیاج به مطالعات تکمیلی می‌باشد.

منابع

۱- پوستی ا.، ادیب مرادی م.، فضیلی ا. ۱۳۸۵. بافت شناسی مقایسه ای، انتشارات دانشگاه تهران، ویرایش دوم.

۲- ضرغامی رهبانی، ن.، نصرت ا..، م. ۱۳۸۱. آسیب‌های اکسیداتیو DNA در اسپرم مردان نابارور، فصلنامه باروری و ناباروری ،۱۳۸۱،ص۶۵-۷۴

۳- اشراقی، س. ۱۳۸۸. مطالعه اثرات ضدباکتریایی و فیتوشیمیایی عصاره تام ۱۲ گونه گیاهان بومی ایران بر سوش‌های بیماری‌زای نوکاردیا، پژوهش‌های دامپزشکی، شماره ۸۲.

۴- عربی، م. ۱۳۸۳. اثرات آنتی اکسیدانی منگنز بر اسپرم انسانی تیمار شده در شرایط مختلف: مقایسه باروی، نیکل و ترولوکس، مجله زیست شناسی ایران، جلد۱۷، شماره ۴، صفحات ۳۲۸-۳۱۵.

۵- کفاشی الهی، ر. ۱۳۹۰. اثر گیاه خار خسک بر بافت شناسی و اندازه بیضه در موش صحرایی، مجله دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، دوره۵، شماره۱

۶- کوئیرا ، ج. ۱۳۸۹. بافت شناسی پایه، ترجمه غلامرضا حسن زاده و همکاران، ویرایش دوازدهم.

7-Aitken R.J., Fisher H. (1994), Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioassays*, 16: 259-268.

8. Amin A., Hamza A.A. (2006), Effects of roselle and ginger on cisplatin-induced reproductive toxicity in rats. *Asian Journal of Andrology*, 8(5): 607-12.

9. Arabi M., Anand R.J.K., Kanwar U. (2001), Analysis of the impact of caffeine on membrane integrity, redox ratio and GST in human ejaculated sperm: effectiveness of antioxidants. *Proceeding of International Congress of Andrology*, Short Communication: 365-369.

10. Arabi M. (2004), Nicotinic infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. Andrologia 36: 305-310 .7-Arabi, M. and Anand, R.J.K. 2002, Effect of nicotine on normospermic men: modulation by antioxidants. *Medical Journal of Reproduction anf Infertility*, 3 (11):11-22 .

11.Arabi M., Sanyal S.N., Kanwar U., Anand, R.J.K. (2003), The Effect of antioxidants on nicotine and caffeine induced changes in human sperm -An in vitro Study. In: Male fertility and lipid metabolism, (eds: De Vriese, S.R., and Christophe, A.B.) Chapter 16, AOCS Press, USA, pp. 250-267 .

12. Arabi M. (2004), Analysis of impact of metal ion contamination on Carp (Cyprinus carpioL.). *Biological Trace Element Research*, 100(3): 229-246.

13. Badade Z.G. (2011), oxidative stress adversely affects spermatogenesis in male infertility. *Biomedical Research*, 22(3): 323-328

14- Brzezinska-Slebodzinska E., Slebodzinska A.B., Pietras B., Wieczorek G. (1995), Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biological Trace Element Research*, 47: 69-74.

15. Donnelly E.T., Neil M., Lewis E.M. (1999), Antioxidant supplementation in vitro does improve human sperm motility. *Fertility and Sterility*, 72(3): 84-495.

16. Ebisch I.M., Thomas C.M., Peters W.H., Braat D.D., Steegers-Theunissen R.P. (2007), The importance of folate,zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Journal of Human Reproduction Update*, 13(2): 163-174.

17. Greep R.O. (1996), Histology; 2nd ed.The Blakiston Division Mc Graw- Hill Co. Inc. New York, London, Sydney and Torento.

18. Hammersen F. (1985), Histology A color atlas of cytology microscopic anatomy; 3ed .Urban and Schwarzeniberg. Baltimore and Munich.Synopsis of histology. The Blakiston Division; McGraw-Hill book Co. Inc. New York, Torento and London.

19- Hendin E.N., Kolettis P.N., Sharma P.K. (1999),Varicocele is associated with elevated spermatozoa active oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *Journal of Urology*, 161(6): 1831-1834.

20. Hida H. , Coudray , C. ,Calop , J. and Favier , A. (1995), Effect of antioxidants on adriamycin-induced microsomal lipid peroxidation. *Biology Trace of Element Research*, 47: 111-116.

21.Iwasaki , A. and Gagnon , A. (1992), Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertility and Sterility*, 57: 409-416.

22. Leblond C.P., Clermont Y. (1952), Spermiogenesis of therat, mouse, hamster, and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acidtechnique. *American Journal of Anatomy*, 90:167-216.

23. Meistrich M.L., Hess R.A. (2013), Assessment of spermatogenesis through staging of seminiferous tubules. *Methods of Molecular Biology*, 927: 299-307.

24- Quzman E.G., Ollero M., Lopez M.C. (2001), Differential production of reactive oxygen species stages of maturation. *Human Reproduction*, 16(8):1922-1930.

25. Sika Suresh C. (1995), Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Male Infertility. Journal of Andrology. (1995): 464-468

26. Sharma R.K., Agarwal A. (1996), Role of reactive oxygen species in male infertility. *Journal of Uroloy*, 48: 835-850.

27. Tabaraki R. (2012), Chemical Composition and Antioxidant Properties of *Malva sylvestris* L. *Journal of the Royal Asiatic Society*, 8(1): 59-68

28. Yeole N.B. Sandhya P., Chaudhari P.S., Bhujbal P.S. (2010), Evaluation of *Malva sylvestris* and *Pedalium murex* Mucilage Suspending Agent. *International Journal of Pharm Tech Research*, 2(1): 385-389.