



Semnan University



Research Article

Ethanol-induced testicular damage and evaluation of melatonin's effect on repair and reproductive system

Mohammad Hesam Beydokhti Nejad ¹, Hamid Reza Mohammadi ^{2*}, Seyed Javad Ahmad Panahi ³, Sahar Qaffari Khaligh ⁴, keyvan Keramati ³.

Abstract

This study aimed to assess the protective role of melatonin against ethanol-induced oxidative damage in the testes of adult rats. Thirty-two rats were randomly assigned into four groups: Group 1 (negative control) received normal saline orally and intraperitoneally; Group 2 (positive control) received 30% ethanol (3 g/kg orally) and saline intraperitoneally; Group 3 received ethanol plus melatonin at a subclinical dose (5 mg/kg IP); Group 4 received ethanol plus melatonin at a clinical dose (10 mg/kg IP). Blood samples were collected for serum testosterone analysis by CLIA, and testes were harvested, weighed, and histologically processed. Ethanol significantly decreased testicular weight, serum testosterone levels, and histomorphometric indices compared to controls. The group receiving 5 mg/kg melatonin showed significant improvements in testicular weight, testosterone levels, and the number of primary spermatocytes and spermatids, though other parameters remained unchanged. In contrast, the 10 mg/kg melatonin group exhibited significant improvements in all measured parameters. These findings suggest that melatonin, particularly at clinical doses, may effectively mitigate ethanol-induced testicular damage by reducing oxidative stress and enhancing structural and hormonal recovery of the reproductive system.

Keywords: Testicular injuries, Melatonin, Reproductive System.

1. Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

2. Department of Clinical sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Semnan, Semnan, Iran.

3. Department of Basic sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Semnan, Semnan, Iran.

4. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Semnan, Semnan, Iran.

*Corresponding author: hr.mohammadi@semnan.ac.ir

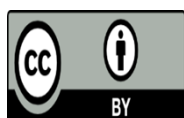
DOI: [10.22075/jvml.2025.36484.1146](https://doi.org/10.22075/jvml.2025.36484.1146)

Received: 07.01.2025

Accepted: 03.02.2025

How to Cite this Article:

Mohammadi, H.R., & Beydokhti Nejad, M.H., & Ahmad Panahi, S.J., & Qaffari Khaligh, S., & Keramati, K. (2025). Ethanol-induced testicular damage and evaluation of melatonin's effect on repair and reproductive system, 17(1), 1-11. doi:10.22075/jvml.2025.36484.1146



©2025 The Author(s): This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, As long as the original authors and sources are cited. No permission is required from the authors or the publishers

القا آسیب در بیضه توسط اتانول و ارزیابی اثر ملاتونین بر ترمیم و شاخص های دستگاه تولید مثلی

محمد حسام بیدختی نژاد^۱، حمیدرضا محمدی^{۲*}، سید جواد احمد پناهی^۳، سحر غفاری خلیق^۴، کیوان کرامتی^۵

خلاصه

هدف این مطالعه بررسی نقش محافظتی ملاتونین در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از اتانول در بیضه رت های بالغ بود، سی و دو موش به صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند: گروه ۱ کنترل منفی (دریافت نرمال سالین خوراکی و داخل صفاقی)، گروه ۲ کنترل مثبت (دریافت اتانول ۳۰٪ به میزان ۳ گرم بر کیلوگرم خوراکی + سالین داخل صفاقی)، گروه ۳ مداخله با دوز تحت بالینی ملاتونین (اتانول + ۵ میلی گرم بر کیلوگرم ملاتونین) و گروه ۴ مداخله با دوز بالینی ملاتونین (اتانول + ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم ملاتونین). نمونه های خونی جهت اندازه گیری تستوسترون سرمی با روش CLIA جمع آوری شدند. بیضه ها برداشت، وزن کشی و با روش های استاندارد هیستولوژیک بررسی شدند. اتانول منجر به کاهش معنادار وزن بیضه، سطح تستوسترون و شاخص های بافتی شد. در گروه دریافت کننده ۵ میلی گرم ملاتونین، افزایش معناداری در وزن بیضه، تستوسترون، و تعداد اسپرماتوسیت های اولیه و اسپرماتیدها مشاهده شد، اما سایر شاخص ها تغییری نداشتند. دوز بالینی ۱۰ میلی گرم باعث بهبود معنادار تمامی شاخص ها گردید، بنابراین، ملاتونین در دوز بالینی می تواند با کاهش استرس اکسیداتیو به ترمیم ساختاری و هورمونی بیضه کمک کند.

واژه های کلیدی: بیضه آسیب دیده، ملاتونین، دستگاه تولیدمثل.

۱. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

۳. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۴. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

*نویسنده مسئول: hr.mohammadi@semnan.ac.ir

DOI: [10.22075/jvlr.2025.36484.1146](https://doi.org/10.22075/jvlr.2025.36484.1146)

دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۸

پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۵

مقدمه

ملاتونین در دستگاه تولیدمثلی نیز نقش بسیار مهمی دارد. تولید این هورمون با طول نور روز رابطه ی عکس دارد لذا عامل اصلی کنترل تولید مثل در حیوانات فصلی است. مثلاً در گوسفند، بز، گرگ و روباه با کاهش طول روز (پاییز و زمستان) و در مادیان، گربه و خرس با افزایش طول روز (بهار و تابستان) فعلی دیده می شود که ملاتونین به ترتیب به صورت تحریکی و مهارى بر ترشح GnRH اثر می گذارد و همچنین با افزایش گیرنده های پروژسترون تعداد جسم زرد در تخمدان را افزایش می دهد (Romeu et al., 2011) و نرخ باروری را در تخمک پیر به علت اثرات آنتی اکسیدانی افزایش می دهد (Dai et al., 2017). سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل یا گونه های واکنشگر اکسیژن (ROA) نام دارند که سبب استرس اکسیداسیونی و آسیب به غشای سلول ها می شود. افزایش تولید گونه های واکنشگر اکسیژن و یا کاهش آنزیم های آنتی اکسیدانی، نقش مهمی در آسیب های اکسیداسیونی در ارگانها، بافت ها و سلول های مختلفی مانند مغز، قلب و سلول های عروقی داشته و زمینه ساز بسیاری از بیماری ها، مانند فشار خون و آترواسکلروز می باشد و نیز منجر به تنگی عروق و کاهش اکسیژن رسانی و مواد مغذی به بافت ها نیز می گردد. یافته ها نشان می دهند عوامل آنتی اکسیدانی مانند ویتامینهای E, A و C قدرت کمی در حفاظت در برابر رادیکال های آزاد دارند (Czesnikiewicz-Guzik Romeu et al., 2007). ملاتونین می تواند از سد خونی - مغزی و نیز جفت به آسانی عبور کرده و بدون سختی به تمام اجزای داخل سلولی برسد. بنابراین، می تواند از آسیب دیواره های سلولی، ارگان ها و هسته در برابر رادیکال های آزاد محافظت نماید (Col et al., 2010). در پژوهش هایی که به منظور بررسی اثرات آنتی اکسیدانی ملاتونین انجام شد، مشاهده گردید دوزهای دارویی ملاتونین سبب افزایش سطح گلوکاتایون و گلوکاتایون S ترانسفراز و افزایش فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز می شود (Rodriguez et al., 2004). مطالعات نشان می دهد که تجویز اتانول با پراکسیداستو موجب اختلال در عملکرد RNA پیام بر و DNA گشته و باعث اختلال در تکثیر سلول های جنسی در موش های نر بالغ می شود (El-Sokkary et al., 2001).

ملاتونین با تثبیت غشاهای میکروزومی، سبب مقاومت در برابر آسیب اکسیداسیونی می شود (Anisimov et al., 2004). در پژوهش حاضر برای نخستین بار اثر ملاتونین بر بهبود ضایعات ناشی از الکل در بیضه رت های بالغ از لحاظ هیستومورفومتریک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

این مطالعه از نوع تجربی (مداخله ای) بوده و در دسته کارآزمایی آزمایشگاهی تصادفی قرار می گیرد. انجام این پژوهش با اخذ کد اخلاق IR.SU.REC.1399.10 از کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان صورت گرفت و در تمامی مراحل مطالعه رعایت گردید.

در این مطالعه از ۲۰ سر موش های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (۴ گروه ۵ تایی) در محدوده وزنی بین ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات مذکور از مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی آموزشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، واقع در شهیرزاد خریداری شدند و در شرایط دمایی ۲۱ الی ۲۵ درجه سانتی گراد و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. تغذیه رت ها توسط پلت تجاری مخصوص رت صورت گرفت و آب به صورت آزاد در اختیار آنها قرار داده شد. پس از وزن کشی، به طور تصادفی به ۴ گروه آزمایشی تقسیم شدند. جهت القاء آسیب اکسیداتیو از اتانول مطلق (۹۹/۸٪) شرکت سیمین تاک به شکل خوراکی استفاده شد. جهت جلوگیری از آسیب به مخاطات گوارشی، الکل را با آب مقطر به وسیله استوانه مدرج به رقت ۳۰٪ رسانده شد و روزانه با دوز ۳ gr/kg در گروه های هدف گاوژ گردید. جهت پیشگیری و بهبود آسیب اکسیداتیو از پودر ملاتونین (Sigma-Aldrich) استفاده شد و جهت حلالیت بهتر با ۱٪ اتانول رقیق گردید و با دوز ۵ و ۱۰ به صورت داخل صفاقی در گروه های تیمار تزریق شد. گروه کنترل منفی: روزانه به مدت ۲۸ روز ۳ gr/kg نرمال سالین به صورت خوراکی داده شد و تزریق داخل صفاقی نرمال سالین نیز به همین ترتیب انجام شد. گروه کنترل مثبت: برای ایجاد آسیب اکسیداتیو در بیضه از محلول ۳۰٪ اتانول استفاده شد که به میزان ۳ gr/kg به صورت خوراکی، روزانه یک بار و به مدت ۲۸ روز داده شد و تزریق داخل صفاقی نرمال سالین نیز به همین ترتیب انجام شد.

تیمار ۱: به عنوان گروه مداخله‌ای پیش‌گیری با دوز تحت بالینی ملاتونین در نظر گرفته شد. برای ایجاد آسیب اکسیداتیو در بیضه از محلول ۳۰٪ اتانول استفاده شد که به میزان ۳gr/kg به صورت خوراکی داده شد و برای پیش‌گیری، از ملاتونین با دوز ۵ mg/kg به صورت تزریق داخل صفاقی روزانه یک بار و به مدت ۲۸ روز استفاده شد. تیمار ۲: به عنوان گروه مداخله‌ای پیش‌گیری با دوز بالینی ملاتونین در نظر گرفته شد. برای ایجاد آسیب بیضه از محلول ۳۰٪ اتانول استفاده شد که به میزان ۳ به صورت خوراکی داده شد و برای پیش‌گیری، از ملاتونین با دوز ۱۰ gr/kg به صورت تزریق داخل صفاقی، روزانه یک بار و به مدت ۲۸ روز استفاده شد.

وزن کشی و گروه بندی تصادفی رت ها قبل مطالعه صورت گرفت. برای محاسبه ی دوز داروها، تمامی رت ها به صورت هفتگی وزن کشی می شدند و دوزها دارو ها برای هر رت به صورت جداگانه محاسبه شدند. هر روز ساعت ۱۲ ظهر اتانول از طریق گاواژ معدی داده می شد و ملاتونین به صورت داخل صفاقی به گروه های هدف تزریق می شد. موش ها در طول ۲۸ روز، روزانه در ساعت مشخص تحت تیمار با ملاتونین قرار گرفتند. جهت آماده سازی محلول دارو، روزانه ۳۰ mg ملاتونین را با ترازوی دیجیتال آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین کرده و در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر ۱٪ اتانول حل گردیدند و در نهایت با دوز ۵ mg/kg و ۱۰ که مبتنی بر مطالعات قبلی بود (El-Sokkary et al., 1999) به صورت داخل صفاقی تزریق شد.

پس از گذشت ۲۸ روز از شروع پژوهش رت ها با کتامین - زایلازین بیهوش گردیدند و خون گیری از قلب جهت سنجش تستوسترون انجام شد. از هر رت حدود ۵ سی سی خون اخذ شد و در لوله آزمایشگاهی نگهداری شد. سپس، بعد از آسان کشی همه ی حیوانات بیضه را خارج نموده و در سرم فیزیولوژی قرار داده شد و توسط ترازوی دیجیتالی وزن شدند. جهت ثبوت بافتی، بیضه ها بلافاصله بعد از تهیه، در محلول فرمالین ۱۰٪ در ظروف پلاستیکی جداگانه ای نگهداری شد. نمونه خون های اخذ شده به آزمایشگاه پاتوبیولوژی رازی سمنان منتقل شد و با روش CLIA (Chemiluminescence Immunoassay) غلظت تستوسترون سرم سنجیده شد. نمونه های فیکس شده در

فرمالین جهت مطالعه و تهیه مقاطع بافتی مورد استفاده قرار گرفتند.

بعد از مرحله تثبیت بافتی که با فرمالین انجام شد با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاری، برش هایی با ضخامت ۵ میکرون از نمونه ها تهیه شد. برای رنگ آمیزی برش های بافتی از روش متداول هماتوکسیلین اتوزین (H&E) استفاده شد. پس از طی مراحل رنگ آمیزی، اسلاید ها توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. جهت شمارش سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید، سرتولی و لیدیگ نیز از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی X ۱۰۰۰ استفاده شد و از هر لام ۱۰ لوله ی منی ساز گرد یا نسبتا گرد به طور تصادفی انتخاب شد و شمارش سلولی انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ انجام شد. گروه ها از نظر آماری از طریق تست آنالیز واریانس یک طرفه تحلیل شدند. یافته ها به صورت میانگین و انحراف معیار بیان و مقادیر $P \leq 0.05$ معنی دار تلقی گشت. جهت ارزیابی تفاوت معنی دار بین گروه ها از تست توکی استفاده شد.

نتایج

مشخص گردید که میانگین وزن بیضه ها در گروه کنترل مثبت نسبت به سایر گروه ها کاهش معنی دار، دارد (جدول ۱) میانگین وزن بیضه ها در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی کمتر بود ولی تغییری معنی دار نداشت و در مقایسه با گروه کنترل منفی، کاهش معنی دار و در مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایش معنی دار داشت. میانگین وزن بیضه ها در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی در مقایسه با گروه کنترل مثبت، افزایش معنی دار داشت و در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی و گروه کنترل منفی تغییری معنی دار نداشت اگرچه به ترتیب بیشتر و کمتر بود. میانگین غلظت تستوسترون سرم در گروه کنترل مثبت نسبت به سایر گروه ها کاهش معنی دار، دارد. (جدول ۱).

میانگین غلظت تستوسترون سرم در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی کمتر بود ولی تغییری معنی دار نداشت و در مقایسه با گروه کنترل منفی، کاهش معنی دار و در مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایش معنی دار داشت.

میانگین غلظت تستوسترون سرم در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی در مقایسه با گروه کنترل مثبت، افزایشی معنی‌دار داشت و در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی و گروه کنترل منفی تغییری معنی‌دار نداشت اگرچه به ترتیب بیشتر و کمتر بود. (جدول ۱). میانگین قطر مجاری سمینفروس در گروه کنترل مثبت، نسبت به گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی و گروه کنترل منفی کاهش معنی‌دار و در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی با وجود آن که مقدار کمتری دارد ولی تغییر آن معنی‌دار، نیست. میانگین قطر مجاری سمینفروس در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی در مقایسه با گروه کنترل منفی، کاهش معنی‌دار داشت ولی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی و گروه کنترل مثبت، تغییر معنی‌دار نداشت اگرچه به ترتیب کمتر و بیشتر بود. میانگین قطر مجاری سمینفروس در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی در مقایسه با گروه کنترل مثبت، افزایشی معنی‌دار داشت ولی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی و گروه کنترل منفی، تغییر معنی‌دار نداشت اگرچه به ترتیب بیشتر و کمتر بود. میانگین قطر اپی تلیوم زایا در گروه کنترل منفی، در مقایسه با سایر گروه‌ها بزرگی معنی‌دار، دارد. میانگین قطر اپی تلیوم زایا در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی و کنترل منفی، کاهش معنی‌دار داشت ولی در مقایسه با گروه کنترل مثبت تغییر معنی‌دار نداشت، اگرچه مقداری بیشتر بود. میانگین قطر اپی تلیوم زایا در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی در مقایسه با گروه کنترل منفی کاهش معنی‌دار داشت و در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی و گروه کنترل مثبت، افزایشی معنی‌دار داشت (جدول ۱).

میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه کنترل منفی در مقایسه با سایر گروه‌ها، بزرگی معنی‌دار، دارد. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی در مقایسه با گروه کنترل منفی، کاهش معنی‌دار داشت ولی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی و گروه کنترل مثبت، تفاوت معنی‌دار نداشت، اگرچه به ترتیب کمتر و بیشتر بود. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه

دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی، تفاوت معنی‌دار نداشت اگرچه بیشتر بود و در مقایسه با گروه کنترل منفی، کاهش معنی‌دار و در مقایسه با گروه کنترل مثبت، افزایشی معنی‌دار داشت (جدول ۲).

میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در گروه کنترل منفی در مقایسه با سایر گروه‌ها، بزرگی معنی‌دار، دارد. میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی در مقایسه با گروه کنترل منفی، کاهش معنی‌دار داشت ولی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی و گروه کنترل مثبت، تفاوت معنی‌دار نداشت، اگرچه به ترتیب کمتر و بیشتر بود. میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی، تفاوت معنی‌دار نداشت اگرچه بیشتر بود و در مقایسه با گروه کنترل منفی، کاهش معنی‌دار و در مقایسه با گروه کنترل مثبت، افزایشی معنی‌دار داشت (جدول ۲).

میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه در گروه کنترل مثبت نسبت به سایر گروه‌ها کاهش معنی‌دار، دارد. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی و گروه کنترل مثبت منفی، کاهش معنی‌دار و در مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایشی معنی‌دار داشت. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی و در مقایسه با گروه کنترل منفی تفاوت معنی‌دار نداشت و در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی و گروه کنترل مثبت، افزایشی معنی‌دار داشت. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروه کنترل مثبت نسبت به سایر گروه‌ها کاهش معنی‌دار، دارد. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی و گروه کنترل منفی، کاهش معنی‌دار و در مقایسه با گروه کنترل مثبت، افزایشی معنی‌دار داشت. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی در مقایسه با گروه کنترل منفی، کاهش معنی‌دار و در مقایسه با گروه کنترل مثبت، افزایشی معنی‌دار داشت. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتید در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی و در مقایسه با گروه دریافت کننده

ملاتونین با دوز تحت بالینی و گروه کنترل مثبت، افزایشی معنی دار داشت. (جدول ۲). میانگین تعداد سلول های لیدیگ در گروه کنترل منفی در مقایسه با سایر گروه ها، بزرگی معنی داری دارد. میانگین تعداد سلول های لیدیگ در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی و گروه کنترل منفی، کاهش معنی دار و در

مقایسه با گروه کنترل مثبت، اگرچه بیشتر بود ولی تفاوت معنی داری نداشت. میانگین تعداد سلول های لیدیگ در گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز بالینی در مقایسه با گروه کنترل منفی کاهش معنی دار و در مقایسه با گروه دریافت کننده ملاتونین با دوز تحت بالینی و گروه کنترل مثبت، افزایشی معنی دار دارد. (جدول ۲).

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار وزن بیضه، غلظت تستوسترون، قطر لوله های منی ساز و ضخامت اپی تلیوم زایا. حروف نامشابه، بیانگر تفاوت معنی دار در سطح ۵ درصد است

میانگین وزن بیضه و انحراف معیار	میانگین غلظت تستوسترون و انحراف معیار	میانگین قطر لوله های منی ساز و انحراف معیار	میانگین ضخامت اپی تلیوم زایا و انحراف معیار
کنترل منفی	$2/58 \pm 0/18$ ^a	$2/32 \pm 0/21$ ^a	$394 \pm 23/02$ ^a
کنترل مثبت	$1/76 \pm 0/18$ ^b	$1/44 \pm 0/17$ ^b	$292/4 \pm 15/45$ ^b
ملاتونین با دوز تحت بالینی	$2/20 \pm 0/16$ ^c	$1/81 \pm 0/14$ ^c	$338/4 \pm 5/85$ ^{bc}
ملاتونین با دوز بالینی	$2/36 \pm 0/10$ ^{ac}	$2/08 \pm 0/08$ ^{ac}	$348/6 \pm 45/44$ ^{ac}

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار سلول های اسپرماتوگونی، سرتولی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و لیدیگ. حروف نامشابه، بیانگر تفاوت معنی دار در سطح ۵ درصد است.

میانگین تعداد سلول های اسپرماتوگونی و انحراف معیار	میانگین تعداد سلول های سرتولی و انحراف معیار	میانگین تعداد سلول های اسپرماتوسیت اولیه و انحراف معیار	میانگین تعداد سلول های اسپرماتید و انحراف معیار	میانگین تعداد سلول های لیدیگ و انحراف معیار
کنترل منفی	$58/44 \pm 4/47$ ^a	$21/44 \pm 2/48$ ^a	$89/2 \pm 3/2$ ^a	$120 \pm 7/9$ ^a
کنترل مثبت	$39 \pm 3/16$ ^b	$12/62 \pm 1/55$ ^b	$47/8 \pm 1/98$ ^b	$60 \pm 7/9$ ^b
ملاتونین با دوز تحت بالینی	$45 \pm 2/23$ ^{bcd}	$15/06 \pm 1/53$ ^{bcd}	$64/2 \pm 2/2$ ^c	$75/4 \pm 3/64$ ^c
ملاتونین با دوز بالینی	$50/16 \pm 4/07$ ^{cd}	$17/36 \pm 2/12$ ^{cd}	$82/3 \pm 2/9$ ^a	$96/8 \pm 5/8$ ^d

بحث

پژوهش حاضر اثرات اتانول و ملاتونین را بر روی تغییرات وزن بیضه، غلظت تستوسترون سرم و پارامتر های هیستومورفومتریک بیضه شامل قطر مجاری منی ساز و ضخامت اپی تلیوم زایگر آن ها و تعداد سلول های لیدیگ، سرتولی، اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید بررسی نمود. این پارامتر ها می توانند اطلاعات مفیدی در

ارتباط با پتانسیل باروری حیوانات ارائه دهند. در این پژوهش تجویز ۳ gr/kg اتانول به مدت ۲۸ روز، منجر به کاهش معنی دار وزن بیضه ها شد. Aghaii و همکاران (۲۰۲۱) در مطالعه ایی نشان دادند ال-کارنیتین بر آسیب بیضه ناشی از مصرف اتانول در رت منجر به کاهش معنی دار وزن بیضه، غلظت تستوسترون سرم می شود. لذا

پیشنهاد کردند پیشگیری با دوز خوراکی ال-کارنیتین تا حدودی از کاهش وزن بیضه، کاهش قطر لوله های منی ساز و ضخامت اپیتلیوم و کاهش تعداد سلولهای اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و لیدیگ جلوگیری می نماید.

Kumar در سال ۲۰۱۷ دریافت که در رت های نر بالغ نژاد albino تجویز اتانول با دوز ۳ gr/kg به روش گاواژ به مدت چهار هفته باعث کاهش چمشگیر وزن بیضه ها و غلظت تستوسترون سرم می شود.

در این پژوهش تجویز ۳ gr/kg اتانول به مدت ۲۸ روز، منجر به کاهش معنی دار غلظت تستوسترون سرم شد و به طور مشابه احمدی و شجاع زاده در سال ۱۳۹۴ دریافتند که در موش های سوری نر بالغ، تجویز اتانول با دوز ۳ gr/kg به روش گاواژ به مدت ۴۵ روز، منجر به کاهش معنی دار غلظت تستوسترون سرم می شود.

در این پژوهش تجویز ۳ gr/kg اتانول به مدت ۲۸ روز، منجر به کاهش معنی دار قطر مجاری منی ساز و ضخامت اپی تلیوم زایگر آن ها شد و به طور مشابه Kumar در سال ۲۰۱۷ دریافت که در رت های نر بالغ نژاد albino تجویز اتانول با دوز ۳ gr/kg به روش گاواژ به مدت چهار هفته باعث کاهش چمشگیر قطر مجاری سمینیفروس و ارتفاع اپیتلیوم آن ها و افزایش فضای خالی در بافت بینابینی می شود.

در مطالعه ای که Akang و همکاران در سال ۲۰۱۵ در رت های نر بالغ نژاد Sprague-Dawley با تجویز اتانول ۳۰٪ با دوز ۲ gr/kg به صورت خوراکی، روزانه به مدت ۴ هفته انجام دادند، مشخص شد که قطر اپیتلیوم لوله های سمینیفروس تغییر معناداری نداشت ولی قطر لوله های سمینیفروس کاهش چمشگیر داشت و فضای بینابینی عریض تر شد. عدم تغییر معنی دار ضخامت اپی تلیوم زایگر در این مورد احتمالاً به علت دوزاژ کمتر اتانول و تفاوت نژادی در مقایسه با پژوهش حاضر می باشد.

در این پژوهش تجویز ۳ gr/kg اتانول به مدت ۲۸ روز، منجر به کاهش معنی دار سلول های لیدیگ و سرتولی شد. Kumar در سال ۲۰۱۷ دریافت که در رت های نر بالغ نژاد albino تجویز اتانول با دوز ۳ gr/kg به روش گاواژ به

مدت چهار هفته باعث کاهش چمشگیر قطر هسته سلول های سرتولی و لیدیگ می شود.

در این پژوهش تجویز ۳ gr/kg اتانول به مدت ۲۸ روز، منجر به کاهش معنی دار سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید شد. به طور مشابه Zhu و همکاران در سال ۲۰۰۰ نیز نشان دادند که تجویز اتانول سبب آپوپتوز اسپرماتوسیت ها و اسپرماتوگونی ها می گردد. در مطالعه ای که El-Sokkary در سال ۲۰۰۱ در رت های نر بالغ نژاد Sprague-Dawley با تجویز اتانول ۴۰٪ با دوز ۳ gr/kg به صورت تزریق زیرجلدی روزانه به مدت ۳۰ انجام داد، مشخص گردید که اتانول منجر به کاهش چمشگیری در میانگین تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید، سرتولی و لیدیگ می شود.

کاهش معنی دار سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید ممکن است ناشی از کاهش تستوسترون آسیب سلول های سرتولی متعاقب آن باشد چون سلول های سرتولی نقش حمایتی و تغذیه ای از سلول های جنسی را بر عهده دارند.

مالاتونین سیستم آنتی اکسیدانی داخلی را تحریک می کند و فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز، گلوکاتایون S- ترانسفراز، سوپراکسید دیسموتاز و دیگر تیول ها را در خون، کبد و کلیه افزایش می دهد. هم چنین ملاتونین فعالیت گلوکاتایون پروکسیداز و کاتالاز را در بیضه افزایش می دهد (Nishidia, 2005). در این پژوهش تجویز ملاتونین با دوز تحت بالینی و بالینی منجر به افزایش معنی دار وزن بیضه نسبت به گروه کنترل مثبت گشت و تفاوت معنی داری میان دوز بالینی و تحت بالینی وجود نداشت.

در این پژوهش تجویز ملاتونین با دوز تحت بالینی و بالینی منجر به افزایش معنی دار غلظت تستوسترون سرم نسبت به گروه کنترل مثبت گشت و تفاوت معنی داری میان دوز بالینی و تحت بالینی وجود نداشت. به طور مشابه

Mohammad Ghasemi و همکاران در سال ۱۳۸۹ اثر ملاتونین با دوز ۱۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی و روزانه به مدت ۵ روز را جهت بهبود ضایعات ناشی از بوسولفان در بیضه رت های نر بالغ نژاد NMRI بررسی کردند. مشخص شد که در گروه درمان ترکیبی ملاتونین با

بوسولفان، افزایش معنی‌دار غلظت تستوسترون در مقایسه با گروه بوسولفان وجود دارد. تأثیر مستقیم ملاتونین بر تولید تستوسترون در حیوانات مشخص شده است. در واقع سلول های لیدیگ واجد گیرنده ملاتونین اند (Öner-Iyidogan et al., 2001).

در این پژوهش تجویز ملاتونین با دوز تحت بالینی منجر به تغییر معنی‌دار قطر لوله های منی ساز نسبت به گروه کنترل مثبت نشد ولی تجویز ملاتونین با دوز بالینی منجر به افزایش معنی‌دار گشت. به طور مشابه Nikbakht و Hejazi در سال ۲۰۱۵ اثر ملاتونین با دوز ۱۰ mg/kg را به صورت داخل صفاقی بر بهبود ضایعات ناشی از لاموتریجین در بیضه رت های نر بالغ بررسی کردند. مشخص شد که قطر لوله های منی ساز در گروه درمان ترکیبی ملاتونین با لاموتریجین، افزایش معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل مثبت دارد.

Soleimani Mehranjani و Azizi در سال ۲۰۲۰ در پژوهشی اثر ملاتونین با دوز ۲۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی، روزانه به مدت ۷ روز را بر بهبود ضایعات ناشی از دگزامتازون در بیضه رت های نر بالغ نژاد NMRI بررسی کردند. مشخص شد که در گروه درمان ترکیبی ملاتونین با دگزامتازون، میانگین قطر مجاری سمینیفروس نسبت به گروه کنترل مثبت، افزایش چشمگیر دارد.

در این پژوهش تجویز ملاتونین با دوز تحت بالینی منجر به تغییر معنی‌دار ضخامت اپی تلیوم زایا نسبت به گروه کنترل مثبت نشد ولی تجویز ملاتونین با دوز بالینی منجر به افزایش معنی‌دار گشت. به طور مشابه Sobhani و همکاران در سال ۱۳۹۴ در پژوهشی اثر ملاتونین با دوز های ۱۵، ۱۰ و ۲۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی، روزانه به مدت ۳۰ روز را بر بهبود ضایعات ناشی از کلرید کادمیوم در بیضه رت های نر بالغ نژاد ویستار بررسی کردند. مشخص شد که در گروه درمان ترکیبی ملاتونین به ویژه دوز ۲۰ mg/kg با کلرید کادمیوم، ضخامت اپی تلیوم زایا در مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایش چشمگیر دارد.

در مطالعه ای اثر ملاتونین با دوز ۱۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی و روزانه به مدت ۵ روز را بر بهبود ضایعات ناشی از آسپرین در بیضه ی رت های نر بالغ نژاد NMRI

بررسی کردند. مشخص شد که در گروه درمان ترکیبی ملاتونین با آسپرین، میانگین ضخامت اپی تلیوم زایا در مقایسه با گروه کنترل مثبت واجد افزایش معنی‌دار است (Mohammad Ghasemi et al., 2010). در این پژوهش تجویز ملاتونین با دوز تحت بالینی منجر به تغییر معنی‌دار میانگین تعداد سلول های سرتولی و لیدیگ نسبت به گروه کنترل مثبت نشد ولی تجویز ملاتونین با دوز بالینی منجر به افزایش معنی‌دار گشت. به طور مشابه فضیلی و همکاران در سال ۱۳۹۱ در پژوهشی اثر ملاتونین با دوز های ۱۰ و ۲۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی، روزانه به مدت ۱۴ روز را بر بهبود ضایعات ناشی از جمیستابین در بیضه رت های نر بالغ بررسی کردند. مشخص شد که در گروه های درمان ترکیبی ملاتونین با جمیستابین، میانگین تعداد سلول های سرتولی و لیدیگ در مقایسه با گروه کنترل مثبت، واجد افزایش معنی‌دار است.

Nikbakht و Hejazi در سال ۲۰۱۵ اثر ملاتونین با دوز ۱۰ mg/kg را به صورت داخل صفاقی بر بهبود ضایعات ناشی از لاموتریجین در بیضه رت های نر بالغ بررسی کردند. مشخص شد که در گروه درمان ترکیبی ملاتونین با لاموتریجین، میانگین تعداد سلول های سرتولی و لیدیگ در مقایسه با گروه کنترل مثبت افزایش چشمگیر دارد. در واقع با بهبود تعداد و عملکرد سلول های لیدیگ و سرتولی به علت افزایش تولید تستوسترون توسط سلول های لیدیگ و نقش حمایتی سلول های سرتولی، به طور طبیعی تعداد و عملکرد سلول های جنسی نیز بهبود می یابد.

در این پژوهش تجویز ملاتونین با دوز تحت بالینی منجر به تغییر معنی‌دار میانگین تعداد سلول های اسپرماتوگونی نسبت به گروه کنترل مثبت نشد ولی تجویز ملاتونین با دوز بالینی منجر به افزایش معنی‌دار گشت. به طور مشابه Chabra و همکاران در سال ۲۰۱۴ در پژوهشی اثر ملاتونین با دوز های ۵، ۱۰ و ۲۰ mg/kg داخل صفاقی، روزانه به مدت ۵ روز را بر بهبود ضایعات ناشی از سیکلوفسفامید در بیضه موش های نر بررسی کردند. مشخص شد که در گروه های درمان ترکیبی ملاتونین با سیکلوفسفامید، میانگین تعداد سلول های اسپرماتوگونی در مقایسه با گروه کنترل مثبت، افزایش

چشمگیر دارد. در مطالعه حاضر مشخص شد که دوز بالینی ملاتونین باعث کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از اتانول در بافت بیضه می شود. احتمالاً این تغییرات می تواند ناشی از دو مکانیسم باشد: ۱- خاصیت آنتی اکسیدانی قوی ملاتونین، چرا که ملاتونین می تواند فعالیت و یا بروز ژن های آنزیم های آنتی اکسیدان مانند: سوپر اکسید دیس موتاز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پر اکسیداز را تحریک نماید (Reiter et al., 2001). ۲- آنتی آپوپتوتیک ملاتونین، که با مهار روند آپوپتوز سلول های زایا مانع تخریب اسپرماتوژنز می شود (Ateşşahin et al., 2006). نتایج این مطالعه نشان داد که اتانول منجر به کاهش وزن بیضه، غلظت تستوسترون سرم و پارامتر های هیستومورفومتريک بیضه می شود و درمان با دوز بالینی ملاتونین منجر به افزایش وزن بیضه، غلظت تستوسترون سرم و پارامتر های هیستومورفومتريک می گردد.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که تجویز مزمن اتانول با دوز ۳ gr/kg به مدت ۲۸ روز، اثرات منفی چشمگیری بر ساختار و عملکرد بیضه دارد، این اثرات شامل کاهش معنی دار وزن بیضه، کاهش غلظت تستوسترون سرم، کاهش قطر و ضخامت اپی تلیوم مجاری منی ساز، و کاهش تعداد سلول های کلیدی در روند اسپرماتوژنز (از جمله سلول های لیدیگ، سرتولی، اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید) بود، این تغییرات می تواند نشانه ای از اختلال در عملکرد محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گونا دال و آسیب مستقیم به سلول های بیضه به واسطه استرس اکسیداتیو القاشده توسط اتانول باشد. همچنین کاهش تعداد سلول های سرتولی و لیدیگ می تواند با کاهش توان حمایتی و تغذیه ای بیضه از سلول های زایا مرتبط باشد که این امر نیز به کاهش سلول های اسپرماتوگونی و سایر مراحل تمایزی آنها منجر می شود.

در مقابل، تجویز ملاتونین در دو دوز تحت بالینی و بالینی توانست تا حد زیادی از این آسیب ها جلوگیری نماید یا آنها را تعدیل کند. ملاتونین، به ویژه در دوز بالینی، موجب افزایش معنی دار وزن بیضه، بهبود غلظت تستوسترون سرم و بهبود ساختار بافتی بیضه شد. این

اثرات احتمالاً ناشی از خاصیت آنتی اکسیدانی قوی ملاتونین است که موجب افزایش فعالیت آنزیم های دفاعی همچون سوپر اکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز می گردد و از آسیب اکسیداتیو جلوگیری می کند. افزون بر این، نقش آنتی آپوپتوتیک ملاتونین نیز در کاهش مرگ برنامه ریزی شده سلول های زایا و افزایش بقای آنها حائز اهمیت است. وجود گیرنده های ملاتونین بر سطح سلول های لیدیگ نیز نشان دهنده توانایی مستقیم ملاتونین در تحریک تولید تستوسترون است.

به طور کلی می توان نتیجه گرفت که ملاتونین، به ویژه در دوز بالینی، می تواند به عنوان یک عامل محافظتی مؤثر در برابر آسیب های بیضه ای ناشی از مصرف مزمن اتانول عمل کند. این ترکیب طبیعی قادر است از طریق مکانیسم های آنتی اکسیدانی و ضد آپوپتوز، ساختار و عملکرد بیضه را حفظ کرده و روند اسپرماتوژنز را حمایت نماید. یافته های این پژوهش می تواند پایه ای برای مطالعات بیشتر در زمینه استفاده از ملاتونین به عنوان یک درمان مکمل در اختلالات تولید مثلی ناشی از عوامل مخرب محیطی یا شیمیایی فراهم آورد.

تشکر و قدر دانی

نویسندگان این مطالعه از کارشناسان آزمایشگاه علوم پایه و پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان به دلیل حمایت های ارزشمندشان در پیشبرد و فراهم آوردن امکانات لازم جهت انجام این پژوهش قدر دانی می نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می نمایند که این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی ندارد.

مشارکت های نویسندگان

این مقاله مستخرج از پایان نامه دکتری عمومی با مشارکت دکتر محمد حسام بیدختی نژاد، دکتر حمیدرضا محمدی، دکتر سید جواد احمدپناهی، دکتر سحر غفاری خلیق و دکتر کیوان کرامتی انجام شده است.

منابع مالی

این مقاله توسط دانشگاه سمنان حمایت مالی شده است.

References

- Aghaii, M., Ahmadpanahi, J., Mohammadi, H., Yousefi, M., Naeimi, S. (2021). Histomorphometric evaluation of the effect of L-Carnitine on testicular injuries caused by ethanol in rats. *Journal of veterinary Laboratory Research*, 13(2), 137-149. DOI: 10.22075/jvlr.2023.30486.1067.
- Ahmadi A, & Shojazadeh S. (2015). Evaluation of the effect of Experimental of alcoholism on testis tissue and sperm quality in adult mouse model. *Studies in Medical Sciences*, 26 (2), 112-120 (In persian).
- Akang, E. N., Oremosu, A. A., Osinubi, A. A., Dosumu, O. O., Kusemiju, T. O., Adelakun, S. A., Umaru, M. L. (2015). Histomorphometric studies of the effects of Telfairia occidentalis on alcohol-induced gonado-toxicity in male rats. *Toxicology reports*, 2, 968-975. DOI: 10.1016/j.toxrep.2015.06.009 PMID: 28962436.
- Anisimov, V. N. (2003). Effects of exogenous melatonin-a review. *Toxicologic pathology*, 31(6), 589-603. DOI: 10.1080/01926230390257885 PMID: 14585727.
- Ateşşahin, A., Şahna, E., Türk, G., Çeribaşı, A. O., Yılmaz, S., Yüce, A., & Bulmuş, Ö. (2006). Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *Journal of pineal research*, 41(1), 21-27. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2006.00327.x PMID: 16842537.
- Chabra, A., Shokrzadeh, M., Naghshvar, F., Salehi, F., Ahmadi, A. (2014). Melatonin ameliorates oxidative stress and reproductive toxicity induced by cyclophosphamide in male mice. *Human & experimental toxicology*, 33(2), 185-195. DOI: 10.1177/0960327113489052 PMID: 23703819.
- Col, C., Dinler, K., Hasdemir, O., Buyukasik, O., & Bugdayci, G. (2010). Oxidative stress and lipid peroxidation products: effect of pinealectomy or exogenous melatonin injections on biomarkers of tissue damage during acute pancreatitis. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international: HHPD INT*, 9(1), 78-82. PMID: 20133234.
- Czesnikiewicz-Guzik, M., Konturek, S. J., Loster, B., Wisniewska, G., & Majewski, S. (2007). Melatonin and its role in oxidative stress related diseases of oral cavity. *J PhysiolPharmacol*, 58 (3), 5-19. PMID: 17901579.
- Dai, X., Lu, Y., Zhang, M., Miao, Y., Zhou, C., Cui, Z., Xiong, B. (2017). Melatonin improves the fertilization ability of post-ovulatory aged mouse oocytes by stabilizing ovastacin and Juno to promote sperm binding and fusion. *Human reproduction*, 32(3), 598-606. DOI: 10.1093/humrep/dew362 PMID: 28137755.
- El-Sokkary, G. H. (2001). Quantitative study on the effects of chronic ethanol administration on the testis of adult male rat. *Neuroendocrinology Letters*, 22(2), 93-100. PMID: 11335885.
- El-Sokkary, G. H., Reiter, R. J., Tan, D. X., Kim, S. J., Cabrera, J. (1999). Inhibitory effect of melatonin on products of lipid peroxidation resulting from chronic ethanol administration. *Alcohol and Alcoholism*, 34(6), 842-850. DOI: 10.1093/alcalc/34.6.842.
- Fazili A., Pusti E. (2012). Study of protective effect of melatonin on histological changes in spermatogenesis rat treated by jencitabine, 9(2), 683-692 (In persian).
- Kumar, B. S. (2017). Fertility effect of cycas circinalis and ionidium suffruticosum in alcohol induced sterility of male wistar rats-An histomorphometric study. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(2), 825. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.8(2).825-30.
- Mohammad Ghasemi F., Faghani M., Fallah Korkan M. (2010). The Protective Effect of Melatonin on Sperm Parameters, Epididymis and Seminal Vesicle Morphology in Adult Mouse Treated with Busulfa. *Journal of Iranian Anatomical Sciences*, 8 (25-36) (In persian).
- Mohammad Ghasemi F, Khaje Jahromi S, Hedayati Omami N. (2012). Protective Effect of Melatonin on the Quality of Spermatogenesis and Sperm Parameters in the Mice Treated with Acetylsalicylic Acid. *Avicenna J Clin Med*. 18 (4), 29-36 (In persian).
- Nishida, S. (2005). Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and dbetes mellitus. *Endocrine*, 27(2), 131-135. DOI: 10.1385/endo:27:2:131 PMID: 16217126.
- Nikbakht, S., & Hejazi, S. (2015). Protective role of melatonin in histomorphometric changes of fetal mice testis by lamotrigine induced. *Cibtech Journal of Zoology*, 4(1), 37-44. PMID: 28580446 DOI: 10.4067/S0717-95022013000300012.

- Öner-Iyidogan, Y., Gürdöl, F., Öner, P. (2001). The effects of acute melatonin and ethanol treatment on antioxidant enzyme activities in rat testes. *Pharmacological Research*, 44(2), 89-93. DOI: 10.1006/phrs.2001.0828 PMID: 11516256.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Qi, W. (2001). Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *Cell biochemistry and biophysics*, 34(2), 237-256. DOI: 10.1385/CBB:34:2:237 PMID: 11898866.
- Rodriguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V., Reiter, R. J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of pineal research*, 36(1), 1-9. DOI: 10.1046/j.1600-079x.2003.00092.x PMID: 14675124.
- Romeu, L. R. G., da Motta, E. L. A., Maganhin, C. C., Oshima, C. T., Fonseca, M. C., Barrueco, K. F., Soares-Junior, J. M. (2011). Effects of melatonin on histomorphology and on the expression of steroid receptors, VEGF and PCNA in ovaries of pinealectomized female rats. *Fertility and sterility*, 95(4), 1379-1384. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.04.042 PMID: 20605140.
- Sobhani M, Rouzbehi A, Mahmoodi R, Sobhani Z. (2015). The Protective Effect of Melatonin on Sperm Morphology and Histology of the Rat Testis Damage Induced by Cadmium Chloride. *J Mazandaran Univ Med Sci*, 25 (123), 32-44 (In persian).
- Soleimani Mehranjani, M., Azizi, M., & Sadeghzadeh, F. (2020). The effect of melatonin on testis histological changes and spermatogenesis indexes in mice following treatment with dexamethasone. *Drug and Chemical Toxicology*, 1-10. DOI: org/10.1080/01480545.2020.1809672.
- Zhu, Q., Meisinger, J., Emanuele, N. V., Emanuele, M. A., LaPaglia, N., & Van Thiel, D. H. (2000). Ethanol exposure enhances apoptosis within the testes. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 24(10), 1550-1556. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2000.tb04574.x PMID: 11045864.