

Effects of saffron extract on sperm parameters in rats with experimentally induced varicocele

F. Amidi*

S. Ebrahimi**

M. Abbasi*

M. Yazdani***

S. Ghasemi****

*Associate Professor of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Assistant Professor of Biology, Babol Payam Noor University, Babol, Iran

***M.Sc. in Biology

****B.Sc. in Laboratory Science, Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Abstract

Background: Varicocele is the most common cause of infertility in men. Increased release of free oxygen radicals is one of the most important mechanisms of damage in the pathophysiology of varicocele.

Objective: The aim of this study was to determine the effects of saffron extract treatment on sperm parameters (sperm count, motility and morphology) in rats with experimentally induced varicocele.

Methods: In this experimental study, 24 male Wistar rats were randomly divided into four groups: varicocele without treatment, sham, control, varicocele with treatment. Varicocele was induced in both varicocele groups. Saffron ethanolic extract (50 mg/kg) was daily administered intraperitoneally in the varicocele group with treatment for eight weeks. After eight weeks, the sperm parameters were studied in all groups. Data were analyzed using one way ANOVA.

Findings: All sperm parameters in the varicocele groups were significantly reduced in comparison to the control group. The sperm parameters were significantly improved by saffron ethanolic extract.

Conclusion: With regards to the results, crocin and safranal in saffron extract which probably eliminate free radicals can be effective in treatment of infertility caused by varicocele.

Keywords: Varicocele, Spermatozoa, Sperm Count, Sperm Motility, Fertility

Corresponding Address: Fardin Amidi, Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Email: Famidi@sins.tums.ac.ir

Tel: +98-21- 66419072

Received: 7 Sep 2013

Accepted: 20 Jul 2014

اثر عصاره زعفران بر شاخص‌های اسپرم در موش‌های صحرایی واریکوسلی

دکتر فردین عمیدی* دکتر سهیلا ابراهیمی** دکتر مهدی عباسی* مهرانه یزدانی*** سودابه قاسمی****

* دانشیار علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی تهران

** استادیار زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور بابل

*** کارشناس ارشد زیست‌شناسی

**** کارشناس آزمایشگاه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی تهران

آدرس نویسنده مسؤل: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح، تلفن ۰۲۱-۶۶۴۱۹۰۷۲-۰۲۱

Email: Famidi@sins.tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۲۹

* چکیده

زمینه: واریکوسل شایع‌ترین علت ناباروری در مردان است. افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های آسیب‌رسان در واریکوسل است.

هدف: مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره زعفران بر شاخص‌های مختلف اسپرم (تحرک، تعداد و مورفولوژی) در موش‌های صحرایی واریکوسلی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۲۴ موش صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به چهار گروه ۶ تایی واریکوسلی، شم، شاهد و واریکوسلی درمانی تقسیم شدند. در گروه‌های واریکوسلی و درمانی، واریکوسل به روش جراحی انجام شد و گروه درمانی روزانه ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره اتانولی زعفران به صورت داخل صفاقی دریافت کردند ۸ هفته بعد شاخص‌های اسپرم در تمام گروه‌ها بررسی و داده‌ها با آزمون آماری آنوای یک طرفه تحلیل شد.

یافته‌ها: تمام شاخص‌های در گروه واریکوسلی نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت. مصرف عصاره اتانولی زعفران سبب بهبود پارامترهای اسپرم شد.

نتیجه‌گیری: براساس یافته‌ها، احتمالاً کروسین و سافرانال موجود در عصاره اتانولی زعفران رادیکال‌های آزاد را حذف می‌کنند و می‌توانند در بهبود ناباروری ناشی از واریکوسل مؤثر باشند.

کلیدواژه‌ها: واریکوسل، اسپرماتوزوآ، تعداد اسپرم، تحرک اسپرم، باروری

* مقدمه:

باروری در تداوم و ثبات زندگی زوجین نقش مهمی دارد. به طور کلی در تمام دنیا ۱۵ درصد افراد نابارورند.^(۱) تقریباً ۵۰ درصد موارد ناباروری مربوط به عوامل مردانه است. علل ناباروری در مردان شامل موتاسیون‌های ژنی، آنوپلوئیدی، بیماری‌های عفونی، انسداد مجرا، واریکوسل، شیمی درمانی، رادیوتراپی و اختلال‌های انزالی است که در این میان واریکوسل یکی از دلایل اصلی اختلال عملکرد بیضه و ناباروری در مردان ذکر شده است.^(۲) واریکوسل به اتساع و پیچش غیرطبیعی وریدهای شبکه

وریدی (پامپینی فورم) داخل طناب اسپرماتیک اطلاق می‌شود.^(۳) در حال حاضر علی‌رغم گزارش‌های متعدد، مکانیسم پاتوفیزیولوژی واریکوسل به درستی شناخته نشده است.^(۴) اگرچه ۱۵ درصد از مردان جوان به این بیماری مبتلا هستند، اما شیوع واریکوسل در مردان نابارور ۴۰ درصد است.^(۵) مطالعه‌های اخیر نشان داده‌اند که همه شاخص‌های اسپرم به طور معنی‌داری در بیماران مبتلا به واریکوسل، کم‌تر از افراد سالم است.^(۶) اخیراً محققان پیشنهاد کرده‌اند که در واریکوسل، تنش اکسیداتیو و

کرده‌اند. طبقه بررسی انجام شده در مورد تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها بر میزان شاخص‌های اسپرم اطلاعات چندانی به دست نیامد؛ بنابراین مطالعه حاضر به منظور تعیین اثر عصاره زعفران بر شاخص‌های مختلف اسپرم (تحرک، تعداد و مورفولوژی) در موش‌های صحرایی واریکوسلی انجام شد.

* مواد و روش‌ها:

در این مطالعه تجربی تعداد ۲۴ سر موش صحرایی بالغ نر نژاد ویستار با وزن ۳۰۰ تا ۴۰۰ گرم استفاده شدند. موش‌ها تحت شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت نور و دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و به طور تصادفی به چهار گروه ۶ تایی تقسیم شدند: گروه شاهد که هیچ‌گونه عمل جراحی بر روی آن‌ها انجام نشد؛ گروه شم که جراحی در آن‌ها انجام گردید، اما ورید کلیوی بسته نشد؛ گروه واریکوسل درمانی که تحت عمل جراحی جهت ایجاد واریکوسل قرار گرفتند و عصاره زعفران را روزانه به مدت ۸ هفته به صورت داخل صفاقی دریافت کردند و گروه واریکوسلی که جهت ایجاد واریکوسل جراحی شدند.

بلوغ در موش صحرایی در 50 ± 10 روزگی رخ می‌دهد و بلوغ جنسی به طور معمول بعد از ۲ ماه ایجاد می‌شود. بر این اساس از موش‌های ۷ هفته‌ای استفاده شد.^(۱۷) برای القای واریکوسل از روش جراحی Koksai و همکاران استفاده شد. موش‌ها تحت شرایط استریل با محلول کتامین ۱ درصد به میزان ۴۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم و محلول زایلازین ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم از طریق تزریق داخل صفاقی بی‌هوش شدند. سپس یک برش عمودی ۳ تا ۴ سانتی‌متری در خط وسط شکم ایجاد شد. پس از یافتن ورید کلیوی چپ و محل ورود ورید اسپرماتیک داخلی به آن، به آرامی اطراف ورید کلیوی چپ آزاد گردید. سپس در گروه واریکوسلی و درمانی سوزن ۲۰ به موازات ورید قرار داده و با نخ نایلون ۴ صفر روی ورید کلیوی چپ گره زده شد؛ به طوری که محل گره بعد از

برگشت متابولیت‌ها به بیضه علت اصلی ناباروری است و در این رابطه رادیکال‌های آزاد اکسیژن نقش مهم‌تری دارند.^(۷) رادیکال‌های آزاد اکسیژن عوامل اکسیدکننده بسیار فعالی هستند که آنیون سوپراکسید (O_2^-) پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال‌های هیدروکسیل (OH^-) از مهم‌ترین آن‌ها در زیست‌شناسی تولید مثل به حساب می‌آیند.^(۸) از بین سلول‌های تولیدکننده رادیکال آزاد اکسیژن [Reactive Oxygen Pieces (ROS)] لکوسیت‌های سمینال و اسپرم غیرطبیعی منابع اصلی تولید ROS در انزال انسان هستند.^(۹) عوامل محافظتی در برابر ROS مانند آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند معرف‌های درمانی مفیدی برای ناباروری مردان باشند.^(۱۰) مکانیسم‌های متفاوتی برای مهار تنش اکسیداتیو و کاهش آسیب‌های ناشی از ROS وجود دارد که یکی از آن‌ها سیستم آنتی‌اکسیدان است.^(۱۱) آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان پاک‌سازی‌کننده رادیکال‌های آزاد، اسپرم را در برابر ROS محافظت می‌کنند.^(۱۲)

زعفران (*Crocus* یا *Officinarum Saffron*) متعلق به رده تک‌لپه‌ای‌ها، تیره زنبق و جنس کروکوس یا زعفران است. رنگدانه‌های موجود در کلاله زعفران از گروه کاروتنوئیدهای دارای عامل کربوکسیل است. از میان گلیکوزیدهای کاروتنوئیدی محلول در آب، کروستین اهمیت بیش‌تری دارد.^(۱۳) کروستین و کروستین‌عوامل رنگ در زعفران هستند. مطابق بررسی‌های انجام شده، از کل مقدار کروستین موجود در کلاله زعفران ۹۴ درصد آن به صورت ترکیب گلیکوزیدی در کروستین و ۶ درصد آن به صورت کروستین آزاد است.^(۱۴) پیکروکروستین و سافرانال عامل طعم، عطر و آنتی‌اکسیدانی زعفران هستند.^(۱۵) عصاره زعفران، کروستین و سافرانال مانع عمل بی‌رنگ‌کنندگی رادیکال‌ها می‌شوند و مقدار آن‌ها در عصاره الکلی زعفران نسبت به عصاره آبی آن بیش‌تر است.^(۱۶)

در دهه‌های اخیر کشورهای توسعه یافته به استفاده از مواد طبیعی به عنوان منبعی برای ساخت داروها توجه

آن‌ها به عنوان درصد تحرک ثبت شد. محاسبه میزان تحرک اسپرم‌ها نیز برای هر نمونه ۳ بار تکرار شد. سپس میانگین به دست آمده به عنوان نتیجه نهایی ثبت گردید. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS ۳/۵ و آزمون آماری آنوای یک طرفه تحلیل شدند.

برای شمارش تعداد اسپرم‌ها از لام نئوبار یا لام هموسیترومتر استفاده گردید. ابتدا نمونه‌ها به نسبت ۱ به ۹ نرمال سالین ۳ درصد رقیق شدند تا اسپرم‌ها برای شمارش کاملاً بی‌حرکت شوند. بعد یک قطره از محلول فوق با استفاده از میکروپپت به آرامی روی لام نئوبار منتقل و روی آن با لامل پوشانده شد. پس از ۵ دقیقه تأمل جهت ته نشین شدن اسپرم‌ها، با استفاده از بزرگ نمایی ۴۰، اسپرم‌هایی که دارای سر، ناحیه میانی و دم بودند شمارش شدند.^(۱۹)

برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم (تشخیص اسپرم‌های طبیعی از غیرطبیعی) از رنگ‌آمیزی اتوزین- نیگروزین استفاده شد.^(۲۰) اسپرم‌های طبیعی در یک نمونه از نظر مورفولوژی در ناحیه سر، گردن و دم مشکلی نداشتند. پس از رنگ‌آمیزی از هر نمونه ۱۰۰ عدد ارزیابی شد.

* یافته‌ها:

تمام شاخص‌های اسپرم (درصد تحرک، تعداد و مورفولوژی طبیعی) در گروه واریکوسلی نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت و مصرف عصاره زعفران باعث بهبود شاخص‌ها شد (جدول شماره ۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین شاخص‌های اسپرم در گروه‌های مورد مطالعه

| گروه | واریکوسل | شم | شاهد | درمان |
|-----------------|----------|--------|---------|---------|
| شاخص اسپرم | ۵۳±۵/۱ | ۷۸±۱۱ | ۷۸±۲/۸۱ | ۷۳±۸/۲ |
| درصد تحرک | ۹۲±۸/۰۹ | ۱۳۹±۷ | ۱۵۴±۸ | ۱۳۱±۶/۴ |
| تعداد | ۶۸±۶/۴ | ۸۷±۸/۲ | ۸۸±۴/۱ | ۸۴±۵/۰۳ |
| مورفولوژی طبیعی | | | | |

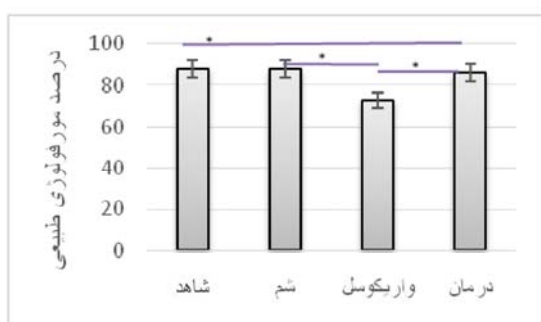
درصد اسپرم‌های با تحرک مناسب در نمونه‌های شاهد، شم و تیمار شده به طور معنی‌داری بیش‌تر از

محل ورود و ورود اسپرماتیک داخلی به ورید کلیوی باشد. بعد از گره زدن، سوزن به آرامی خارج و به ورید اجازه داده شد که به حالت طبیعی برگردد. سپس محل مورد نظر با سوزن نایلون ۳ صفر بخیه زده شد. این امر قطر ورید کلیه چپ را حدود ۵۰ درصد کاهش خواهد داد. در گروه شم تمام مراحل جراحی انجام شد ولی بدون گره زدن، سوزن خارج گردید. تمام گروه‌ها به مدت ۸ هفته در حیوان خانه با کنترل نور و دما نگهداری و با یک نوع آب و غذا تغذیه شدند. برای تهیه عصاره، ابتدا زعفران به صورت پودر تهیه و سپس به کمک حلال اتانولی (۱۰ گرم پودر در ۵۰۰ میلی‌لیتر گرم اتانول ۸۰ درجه) با روش ماسراسیون (Maceration) عصاره‌گیری شد. روزانه ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از این محلول به صورت داخل صفاقی و به مدت ۸ هفته به گروه درمانی تزریق شد تا اثر آن بر روی یک سیکل کامل اسپرماتوژنزرت که حدود ۵۶ روز است، بررسی شود.^(۱۸) پس از ۸ هفته، مراحل ارزیابی اسپرم بر روی تمام گروه‌ها انجام شد. موش‌های مورد مطالعه با استفاده از کلروفورم کشته شدند. گشاد شدن ورید اسپرماتیک داخلی از طریق مشاهده بررسی و ورید یورتال چپ به عنوان شاهد داخلی در نظر گرفته شد. جهت ارزیابی شاخص‌های اسپرم (تعداد، حرکت، مورفولوژی)، نمونه از دم اپیدیدم سمت چپ گرفته شد. فاسیای روی بیضه‌ها با قیچی استریل پاره شد و پس از مشخص شدن اپیدیدیم سمت چپ که مانند عصا بر روی بیضه قرار دارد، دم اپیدیدیم جدا و در محیط کشت Hams-F10 قرار داده شد. اپیدیدیم به چند قسمت تقسیم و سپس به مدت ۱۵ دقیقه داخل انکوباتور قرار داده شد تا اسپرم‌ها از اپیدیدیم خارج و به محیط داخل پتری دیش وارد شوند.

جهت تعیین درصد اسپرم‌های متحرک، یک قطره کوچک از نمونه روی لام قرار داده شد و با بزرگ نمایی ۴۰۰ در زیر میکروسکوپ مشاهده گردید. برای تعیین درصد تحرک اسپرم‌ها ابتدا درصد اسپرم‌های متحرک در چند میدان میکروسکوپ تخمین زده، سپس میانگین

درصد اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی در نمونه‌های شاهد، شم و تیمار شده به طور معنی‌داری بیش‌تر از نمونه‌های واریکوسل بود ($P < 0/001$). مقایسه درصد مورفولوژی طبیعی اسپرم‌ها بین نمونه‌های شاهد با شم و شاهد با درمانی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد که بیان‌گر اثر مثبت زعفران است (نمودار شماره ۳).

نمودار ۳- مقایسه میانگین درصد مورفولوژی طبیعی در چهار گروه مورد مطالعه



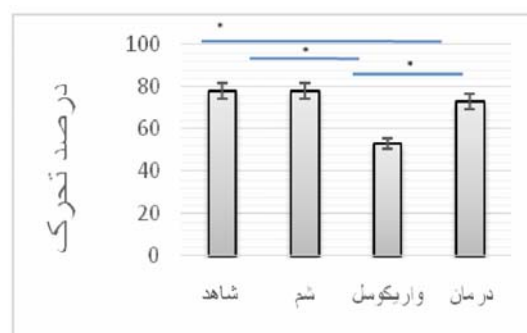
* $P < 0/01$

* بحث و نتیجه‌گیری:

این مطالعه نشان داد مصرف عصاره الکلی زعفران می‌تواند موجب بهبودی شاخص‌های تعداد، تحرک و مورفولوژی طبیعی اسپرم در موش صحرایی شود. مک آنینج در مطالعه‌ای به بررسی میزان تحرک اسپرم در افراد واریکوسلی پرداخت که نتایج کار او از نظر کاهش تحرک اسپرم مشابه یافته‌های مطالعه حاضر بود.^(۲۱) به نظر می‌رسد در گروه واریکوسلی تنش اکسیداتیو، به گروه تیول پروتئین‌های ساختاری و آنزیمی اسپرم حمله و آن را حساس می‌کند. ضعف و کاهش توان اسپرم به کاهش فسفریلاسیون و تولید ATP منجر می‌شود و در نتیجه بر توان تحرک و باروری آن تأثیر منفی می‌گذارد.^(۲۲) واریکوسل بر ناباروری افراد مؤثر است؛ به طوری که درمان واریکوسل در موش‌های صحرایی درمانی مورد آزمایش در مقایسه با موش‌های واریکوسلی بدون درمان توانسته است باروری را ۳۶/۴ درصد افزایش دهد.^(۲۳)

نمونه‌های واریکوسل بود ($P < 0/01$). ولی مقایسه درصد اسپرم‌های با تحرک مناسب بین گروه شاهد با گروه شم و نیز گروه شاهد با گروه درمانی تفاوت معنی‌دار نشان نداد (نمودار شماره ۱).

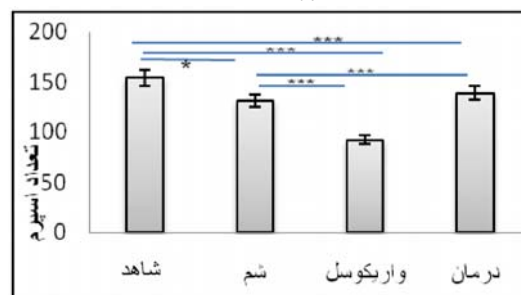
نمودار ۱- مقایسه میانگین درصد تحرک اسپرم در چهار گروه مورد مطالعه



* $P < 0/01$

میزان غلظت (تعداد) اسپرم در نمونه‌های شم، واریکوسل و درمانی نسبت به نمونه‌های شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد؛ به طوری که در نمونه‌های واریکوسل و درمانی این کاهش بیش‌تر از نمونه‌های شم بود ($P < 0/001$). میزان غلظت اسپرم نمونه‌های واریکوسل کاهش معنی‌داری را نسبت به شم نشان داد ($P < 0/001$). این کاهش معنی‌دار در نمونه‌های واریکوسل نسبت به نمونه‌های درمانی نیز مشاهده شد ($P < 0/001$) (نمودار شماره ۲).

نمودار ۲- مقایسه میانگین تعداد اسپرم در چهار گروه مورد مطالعه



* $P < 0/001$

* مراجع:

1. Templeton A, Fraser C, Thompson B. The epidemiology of infertility in Aberdeen. *BMJ* 1990 Jul 21; 301 (6744): 148-52
2. Hauser R, Paz G, Botchan A, et al. Varicocele: effect on sperm functions. *Hum Reprod Update* 2001 Sept-Oct; 7 (5): 482-5
3. Curling TB. Cases of varicocele treated by pressure, with observations. *Med Chir Trans* 1846; 29: 259-68
4. Agarwal A, Sharma RK, Desai NR, et al. Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. *Urology* 2009 Mar; 73 (3): 461-9
5. Enciso M, Muriel L, Fernandez JL, et al. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J Androl* 2006 Jan-Feb; 27 (1): 106-11
6. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, et al. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 2003 Dec; 80 (6): 1431-6
7. Bahmanzadeh M, Abolhassani F, Amidi F, et al. The effects of nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME) on epididymal sperm count, motility and morphology in varicocele rat. *Daru* 2008; 16 (1): 23-8
8. Ozbek E, Cekmen M, Simsek A, et al. Comparison of antioxidant enzyme activity in the internal spermatic vein and brachial veins of patients with infertile varicocele. *Int Urol Nephrol* 2008; 40 (3): 679-83
9. Kumar R, Venkatesh S, Kumar M, et al. Oxidative stress and sperm mitochondrial DNA mutation in idiopathic oligoasthenozoospermic men. *Indian J Biochem Biophys* 2009 Apr; 46 (2): 172-7

مطالعه‌های بسیاری در مورد گیاهان دارویی با خواص آنتی‌اکسیدانی انجام شده است. به طور مثال، مطالعه امینی در سال ۱۳۸۸ بر روی آب انار نشان داد این گیاه به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر روی شاخص‌های اسپرم پس از تنش اکسیداتیو مؤثر بوده و باعث بهبودی تعداد کل اسپرم و کاهش درصد اسپرم‌های غیرطبیعی شده است.^(۲۷)

تارانتیلیس در سال ۱۹۹۴ گزارش کرد که رنگ دانه‌های موجود در کلاله زعفران از گروه کاروتنوئیدهای دارای عامل کربوکسیل هستند و یکی از رنگ دانه‌های محلول در چربی آن بتاکاروتن است.^(۱۳) این ماده قادر است با حذف رادیکال آزاد اکسیژن واسطه‌ای (O_2 و O_2^-) واکنش زنجیره‌ای اکسیداسیون این رادیکال‌ها را خاتمه دهد و با اکسید کردن خود از اکسیداسیون سایر مولکول‌ها جلوگیری کند.^(۲۴) بنابراین افزایش میزان تحرک اسپرم در اثر عصاره زعفران در مطالعه حاضر با نتایج تارانتیلیس و کودری مطابقت دارد.

در مطالعه حاضر تعداد اسپرم در گروه تحت درمان با عصاره زعفران نسبت به گروه واریکوسلی افزایش یافت. ونگ در سال ۲۰۰۳، رابطه تنش اکسیداتیو را با تخریب غشای میتوکندری در سلول بیان کرد. به عقیده وی از آنجا که میتوکندری‌ها در روند مرگ سلولی نقش کلیدی ایفا می‌کنند و با توجه به این که غشای داخلی میتوکندری حاوی سیتوکروم C است، در صورت تخریب غشای میتوکندری توسط تنش اکسیداتیو این سیتوکروم از میتوکندری رها و باعث القای مرگ سلولی می‌شود؛ این مرگ سلولی خود می‌تواند آسیب‌های DNA ایجاد شده توسط تنش اکسیداتیو را تشدید کند.^(۲۵) با توجه به نظر ونگ کاهش معنی دار تعداد اسپرم در گروه واریکوسلی نسبت به سایر گروه‌ها قابل توجیه است.

به طور کلی نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد عصاره زعفران موجب بهبود شاخص‌های اسپرم (تحرک، غلظت و مورفولوژی) در موش‌های صحرایی نر واریکوسلی نسبت به گروه شاهد شد.

10. Martin-Du Pan RC, Sakkas D. Is antioxidant therapy a promising strategy to improve human reproduction? Are antioxidants useful in the treatment of male infertility? *Hum Reprod* 1998 Nov; 13 (11): 2984-5
11. Halliwall B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 4th ed. New York: Oxford University Press; 1999. 617-783
12. Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am* 2002 Nov; 29 (4): 817-27
13. Tarantilis PA, Polissiou M, Manfait M. Separation of picrocrocin, cis-trans-crocins and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Chromatogr A* 1994 Mar 25; 664 (1): 55-61
14. Li H, Dubocq F, Jiang Y, et al. Effect of surgically induced varicocele on testicular blood flow and Sertoli cell function. *Urology* 1999 Jun; 53 (6): 1258-62
15. Chen Y, Zhang H, Tian X, et al. Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of *Gardenia jasminoides* ELLIS and *Crocus sativus* L. A relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents. *Food Chem* 2008; 109: 484-92
16. Hosseinzadeh H, Modaghegh MH, Saffari Z. *Crocus sativus* L. (Saffron) extract and its active constituents (crocins and safranal) on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. *Evid Based Complement Alternat Med* 2009 Sep; 6 (3): 343-50
17. Mostafa T, Anis TH, El-Nashar A, et al. Varicolectomy reduces reactive oxygen species levels and increases antioxidant activity of seminal plasma from infertile men with varicocele. *Int J Androl* 2001 Oct; 24 (5): 261-5
18. Heidary M, Vahhabi S, Reza Nejadi J, et al. Effect of saffron on semen parameters of infertile men. *Urol J* 2008 Fall; 5 (4): 255-9
19. Seed J, Chapin RE, Clegg ED, et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation. *Reprod Toxicol* 1996 May-Jun; 10 (3): 237-44
20. Narayana K, Prashanthi N, Nayanatara A, et al. Effects of methyl parathion (o,o-dimethyl o-4-nitrophenyl phosphorothioate) on rat sperm morphology and sperm count, but not fertility, are associated with decreased ascorbic acid level in the testis. *Mutat Res* 2005 Dec 7; 588 (1): 28-34
21. McAninch JW. Disorders of the testis, scrotum and spermatic cord. 15th ed McGraw-Hill; 2000. 684-93
22. Malo C, Gil L, Gonzalez N, et al. Antioxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology* 2010 Aug; 61 (1): 142-7
23. French DB, Desai NR, Agarwa A. Varicocele repair: does it still have a role in infertility treatment? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008 Jun; 20 (3): 269-74
24. Kemal Duru N, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2000 Dec; 74 (6): 1200-7
25. Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol* 2010 Mar; 48 (5): 425-35

26. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, et al. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertile Steril* 2003 Sep; 80 (3): 531-5

27. Kialashaki Mr. Comparison of the chemical composition, cream and saffron

stigma Gonabad and Karaj. M.Sc. Thesis, Tehran University 1989; 12-3

28. Amini Rad O, A Khalili , H.R Soltani Gord Faramarzi et al. Influence of pomegranate juice on sperm parameters and fertility in mice. *J Hormozgan Univ Med Sci* 2009; 13: 183-7