Journal of Animal Biology, Autumn 2024; 17(1):53-61

Research Article

The Effect of Diazepam on the Number of Primary Spermatocytes and Spermatid Cells in Male Rats

Amir Bagher Eilkhani, Maryam Tehranipour*, Saiede Zafar balanegad

Department of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran
Corresponding author: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

Received: 30 January 2024 Accepted: 29 April 2024

DOI:

Abstract

Diazepam, from the benzodiazepine family, has been widely used in recent years due to its sedative and pain-relieving effects. On the other hand, simultaneously with the use of such drugs, many disorders are seen in the process of spermatogenesis, so the purpose of this research is to investigate the effect of diazepam drug use on the number of primary spermatocytes and spermatids in male rats. In this experimental study, 30 male Wistar rats weighing 200-250 grams were selected and randomly divided into 5 groups of 6. The rats in the control group received physiological serum and the rats in the treatment groups received diazepam at doses of 2, 3, 4, and 5 mg/ml of body weight intraperitoneally for 14 days. After anesthetizing the animals, samples were taken from the testicles and a slide was prepared, and the number of primary spermatocytes, Sertoli spermatids and spermatogonia were counted. The data were analyzed using Anova statistical analysis at a significant level ($p < 0.05$). The results showed that the number of cells examined in the treatment group with a dose of 3 mg/ml compared to the control group decreased significantly ($p < 0.05$). Probably, the use of diazepam has reduced the proliferation and division of testicular cells by inhibiting the hypothalamus-pituitary-gonadal axis.

Key words: Diazepam, Primary spermatocyte, Rat.

زیست‌شناسی جانوری، سال هفدهم، شماره اول، پاییز ۱۴۰۳، صفحات ۶۱-۵۳

مقاله پژوهشی

بررسی اثر مصرف داروی دیازپام بر تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید در موش صحرایی نر

امیرباقر ایلخانی، مریم طهرانی‌پور*، سعیده ظفربالانژاد

گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

*مسئول مکاتبات: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۰

DOI:

چکیده

دیازپام از خانواده بنزودیازپین‌ها با اثرات ارامش بخشی و مسکنی در سال‌های اخیر با افزایش اضطراب کاربرد فراوان یافته است. از طرفی همزمان با مصرف این قبیل داروها اختلالات زیادی در روند اسپرماتوژنز دیده می‌شود لذا هدف از این تحقیق بررسی اثر مصرف داروی دیازپام بر تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید در موش صحرایی نر می‌باشد.در این مطالعه تجربی ۳۰ سر رت نر نژاد ویستار با وزن ۲۰۰- ۲۵۰ گرم انتخاب و بطور تصادفی به ۵ گروه ٦ تایی تقسیم شدند. رت‌های گروه کنترل سرم فیزیولوژیکی و رت‌های گروه‌های تیمار دیازپام را با دوزهای ۲، ۳، ٤ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر وزن بدن به طریقه داخل صفاقی برای ١٤ روز دریافت کردند. پس از بیهوشی حیوانات از بیضه نمونه برداری و لام تهیه گردید و تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید، سرتولی و اسپرماتوگونی در آنها شمارش گردید. داده‌ها به کمک آنالیز آماری Anova در سطح معنی‌داری ($P <$ ۰/۰۵) بررسی گردیدند. نتایج نشان داد که تعداد سلول‌های مورد بررسی در گروه تیمار با دوز ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری ($P <$ ۰/۰۵) یافته اند. احتمالا مصرف داروی دیازپام با مهار محور هیپوتالاموس-هیپوفیز- گناد تکثیر و تقسیم سلول‌های بیضه را کاهش داده است.

کلمات کلیدی: دیازپام، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید، موش صحرایی.

مقدمه

دیازپام (Diazepam) که خارج از ایران با نام تجاری والیوم (Valium) شناخته می‌شود، متعلق به دسته ای از داروها به نام بنزودیازپین‌ها است (۱). از دیازپام برای درمان اضطراب (۸)، تشنج، ترک الکل، تسکین اسپاسم عضلانی و ایجاد آرامش قبل از اقدامات پزشکی استفاده می‌شود (٦). دیازپام می‌تواند بخشی از یک درمان ترکیبی باشد .این دارو با آرام کردن مغز و اعصاب اثر می گذارد (۲). در سالهای اخیر با افزایش اضطراب مخصوصا در شهرهای بزرگ مصرف این دارو افزایش پیدا کرده است. دیازپام، گاما آمینوبوتیریک اسید (GABA) را افزایش می‌دهد. اگر گابا کافی نباشد، بدن در حالت هیجانی قرار گرفته و باعث اضطراب، اسپاسم عضلانی یا تشنج می‌شود. با مصرف این دارو گابا بیشتری در بدن ایجاد شده که به کاهش اضطراب، اسپاسم عضلانی و تشنج کمک می‌کند (٤). اختلال در تولید اسپرم و آسیب در این

روند که به اصطلاح اسـپرماتوژنز نامی‌ده می‌شود، از شایع‌ترین علل ناباروری مردان به شمار می‌آید. بنابر گزارش سازمان بهداشـت جهـانی، ناباروری، حدود ۸۰ میلیون زوج در سراسـر دنیا را تحت تاثیر قرار داده است که ۵۰ درصد آن‌ها وابسته به علل مردانه است. بر اساس نظر متخصصان، مطالعات نشان داده‌اند که عوامل محیطی ازجمله مواد سمی، آفت‌کش‌ها، برخی نانوذرات و تشعشعات بر باروری مردان اثر مضری دارد. همچنین دخانیات و کار بدنی سنگین و مشاغل نشسته نیز می‌تواند با ناباروری مردان در ارتباط باشد(۵). ناباروری یک بحران اساسی است که سلامت روانی و اجتماعی زوجین را تهدید می‌کند. هر کدام از زوجین نابارور ممکن است به شیوه متفاوتی به ناباروری و درمان آن واکنش نشان دهند. اما پاسخ های شایع آنها کاهش اعتماد به نفس، اشکال در برقراری ارتباط با دیگران، کاهش رضایت از زندگی اضطراب و افسردگی است (۱٤). در سال های اخیر با وجود پیشرفت در فناوری تولید مثل، تعداد زوج هایی که برای تعیین ناباروری مراجعه می‌کنند رو به افزایش است. در دهه گذشته عوامل دخیل در ناباروری در ۳۰ تا ۵۰ درصد مردان بررسی و به علت های اختلال در اعمال جنسی مردانه اضافه شده است اما با این وجود بسیاری از علت های اساسی ناباروری در مردان هنوز کشف نشده است (۱٤). با توجه به اینکه اقایان نا آگاهانه به هنگام کم خوابی یا اضطراب و درمان بیماری‌های عصبی مانند صرع (۱۱) و...از این دارو مصرف می‌کنند و مطالعات اندکی در زمینه اثرات این دارو بر روند اسپرماتوژنز وجود داشت در طی این تحقیق به بررسی اثرات مصرف دیازپام بر تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید در موش صحرایی نر پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش تجربی در گروه زیست شناسی دانشگاه ازاد اسلامی مشهد با رعایت کامل اصول اخلاقی کار با حیوانات انجام شد. در پژوهش مذکور از داروی تزریقی دیازپام10 (شرکت سبحان)، رنگ ائوزین، نگروزین و رنگ هماتوکسیلن، پارافین جامد و چسب انتلان از شرکت مرک آلمان، ، کتامین و زایلازین شرکت الفاسان هلند، اتیل هیدروکساید مطلق از شرکت کیمیا تهران و نمک سدیم، خالص از شرکت گلپاک شیمی گلپایگان استفاده شده است. در این تحقیق از ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار، حدودا سه ماهه با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. این موش ها از سرم سازی رازی خریداری و در اتاق حیوانات دانشکده علوم و در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای (۲±۲۰ درجه سانتی گراد) و رطوبت مناسب در قفس های مخصوص قابل دسترسی به آب و غذا نگهداری شدند و تنها برای تزریق از قفس خارج شدند. تغذیه موش ها توسط غذای استاندارد فشرده تهیه شده از انستیتو پاستور شعبه آمل و آب صورت گرفت. رت‌های تهیه شده به طور تصادفی به ۵ گروه ٦تایی که شامل گروه‌های کنترل و تیمار با دوز تزریقی ۲، ۳، ٤ و ۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر تقسیم شدند (جدول ۱). داروی دیازپام به شکل آمپول از داروخانه تهیه و در گروه‌های تیمار طبق گروهبندی جدول ۱ با سرنگ انسولین به مدت ۱٤ روز به عضله فمور ران تزریق گردیدند. یک روز پس از پایان تزریق همه حیوانات ابتدا به وسیله کتامین با دوز ٦۰میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلازین با دوز میلی‌گرم بر کیلوگرم ٦ بیهوش گردیدند(۱۹). پس از بیهوش کردن نمونه ها و اطمینان از بیهوشی آنها به وسیله پنس و قیچی قسمت تحتانی بدن رت‌ها به شکل مثلث شکافته شد و بیضه ها از جایگاه خود بیرون آورده شدند. پس از نمونه

برداری از بیضه ها ابتدا آنها توسط سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و جهت مطالعه بافتی در داخل محلول فرمالین ۱۰٪ نمکی قرار گرفتند. به منظور پاساژ بافتی مراحل: آب گیری، الکل گیری یا شفاف کردن و آغشتگی با پارافین و در نهایت قالب گیری انجام شد. از قالب های پارافینی توسط میکروتوم به روش زیر برش تهیه شد. برای تهیه برش بیضه ابتدا عرض را اندازه گیری نموده و به چهار قسمت مساوی تقسیم کرده و در نهایت سه برش طولی به ترتیب نزدیک به اپیدیدیم و ناف بیضه، وسط بیضه و قسمت کناری بیضه تهیه شد. اندازه برش ها بر حسب عرض بیضه ها متفاوت بود. پس از تهیه برش ها جهت مرحله رنگ آمیزی ابتدا پارافین زدایی و سپس آب دهی و در نهایت با رنگ هماتوکسیلین و ائوزین لام‌ها رنگ آمیزی شدند. پس از تهیه لام شمارش سلول‌های موجود در لوله اسپرم ساز با بزرگنمایی ۴۰ و بررسی جزئیات سلول های مورد مطالعه و شناسایی دقیق تر با بزرگنمایی ۱۰۰ انجام پذیرفت. داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری Minitab و آزمون Anova در سطح معنی داری ($p < ۰/۰۵$) تجزیه و تحلیل شدند.

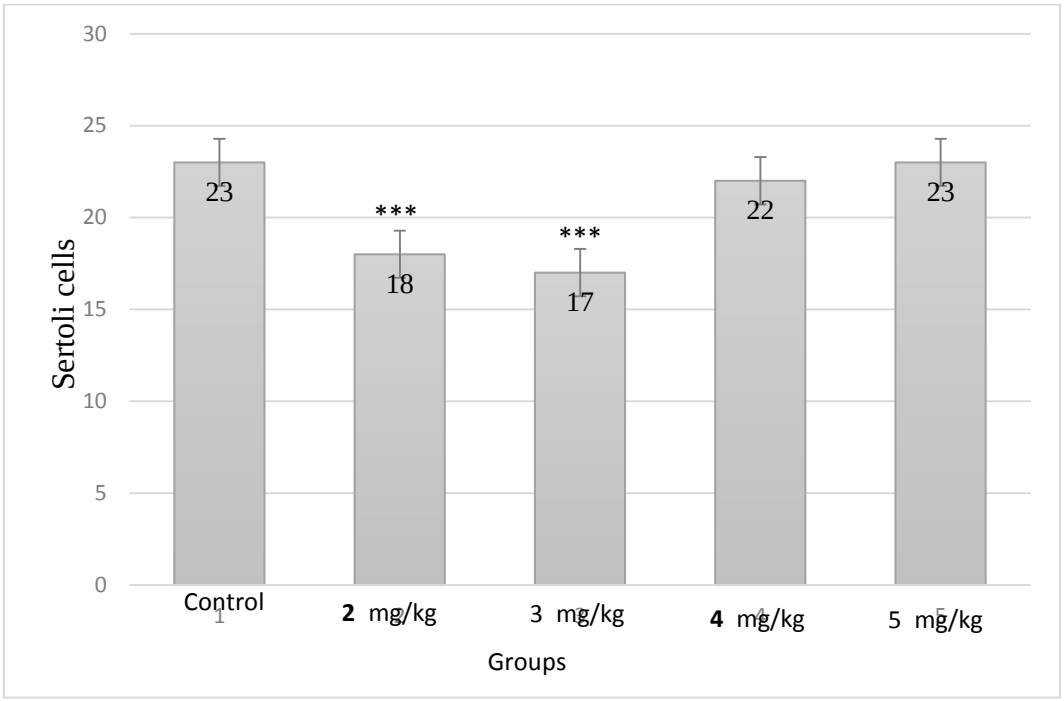
جدول ۱- گروه بندی نمونه‌ها

Table 1- Grouping of samples

Groups	Number	Group specifications
Control	6	Physiologic serum for 14 consecutive days
Treatment 1	6	2 mg/kg Diazepam for 14 consecutive days
Treatment 2	6	3 mg/kg Diazepam for 14 consecutive days
Treatment 3	6	4 mg/kg Diazepam for 14 consecutive days
Treatment 4	6	5 mg/kg Diazepam for 14 consecutive days

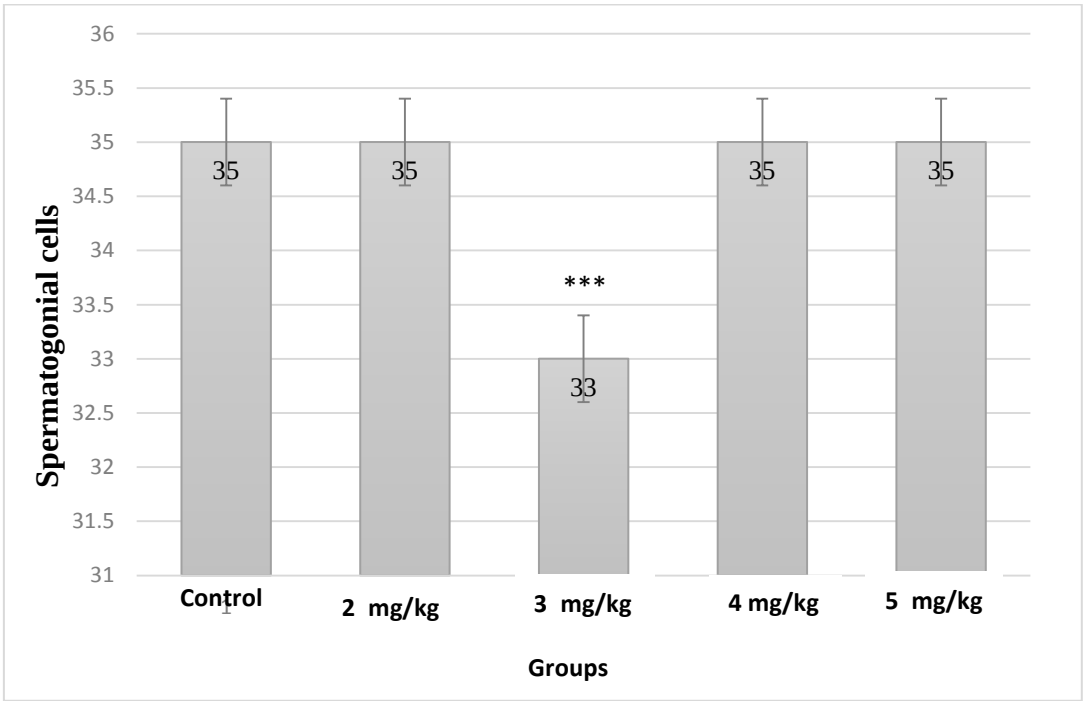
نتایج

از ردیف اول سلولی روی غشای پایه سلول‌های اسپرماتوگنی با هسته های کروی و سلول های سرتولی با هسته های بیضی شمارش گردیده و از ردیف دوم سلول های اسپرماتوسیت یک و سلول های اسپرماتید که دارای هسته های کروی و کوچک بودند شمارش شد و در نهایت نتایج در نمودارهای ذیل خلاصه گردید.طبق نمودار ۱ در گروه‌های تیمار شده با دوزهای تزریقی ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم تعداد سلول های سرتولی نسبت به گروه کنترل کاهش معنا داری دارد ($p < ۰/۰۰۱$). در گروه‌های تیمار شده با دوزهای تزریقی میلی‌گرم بر کیلوگرم ٤ و ٥ میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی داری با گروه کنترل مشاهده نمی‌شود. طبق نمودار ۲ در گروه تیمار شده با دوزی تزریقی ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم تعداد سلول های اسپرماتوگونی نسبت به گروه کنترل کاهش معنا داری دارد ($P < ۰/۰۰۱$). در گروه‌های تیمار شده با دوزهای تزریقی میلی‌گرم بر کیلوگرم ۲ و میلی‌گرم بر کیلوگرم ٤ و میلی‌گرم بر کیلوگرم ٥ تفاوت معنی داری با گروه کنترل مشاهده نمی‌شود. طبق نمودار ۳ در گروه تیمار شده با دوزی تزریقی ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ٤ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ٥ میلی‌گرم بر کیلوگرم تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری دارد ($P < ۰/۰۰۱$). در گروه تیمار شده با دوز تزریقی ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی داری با گروه کنترل مشاهده نمی‌شود. نمودار ٤ نشان می‌دهد که در گروه‌های تیمار شده با دوزی تزریقی ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ٤ میلی‌گرم بر کیلوگرم تعداد سلول های اسپرماتید نسبت به گروه کنترل کاهش معنا داری دارد ($P < ۰/۰۰۱$). در گروه تیمار شده با دوز تزریقی۲ و ٥ میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی داری با گروه کنترل مشاهده نمی‌شود.



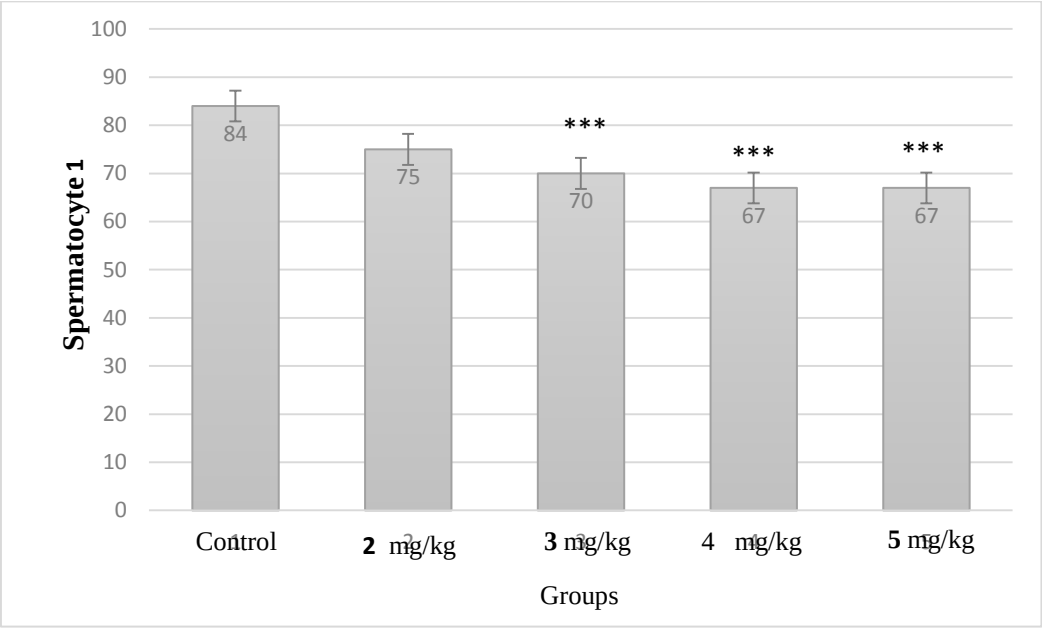
نمودار ۱- مقایسه تعداد سلول های سرتولی در گروه‌های مختلف. مقادیر، مشخص کننده میانگین داده ها ± خطای معیار می‌باشد. *** ($p < ۰/۰۰۱$)

Fig 1. Comparison of the number of Sertoli cells in different groups. The values indicate the mean data ± standard error



نمودار ۲- مقایسه تعداد سلول های اسپرماتوگونی در گروه‌های مختلف. مقادیر، مشخص کننده میانگین داده ها ± خطای معیار می‌باشد. *** ($p <۰/۰۰۱$)

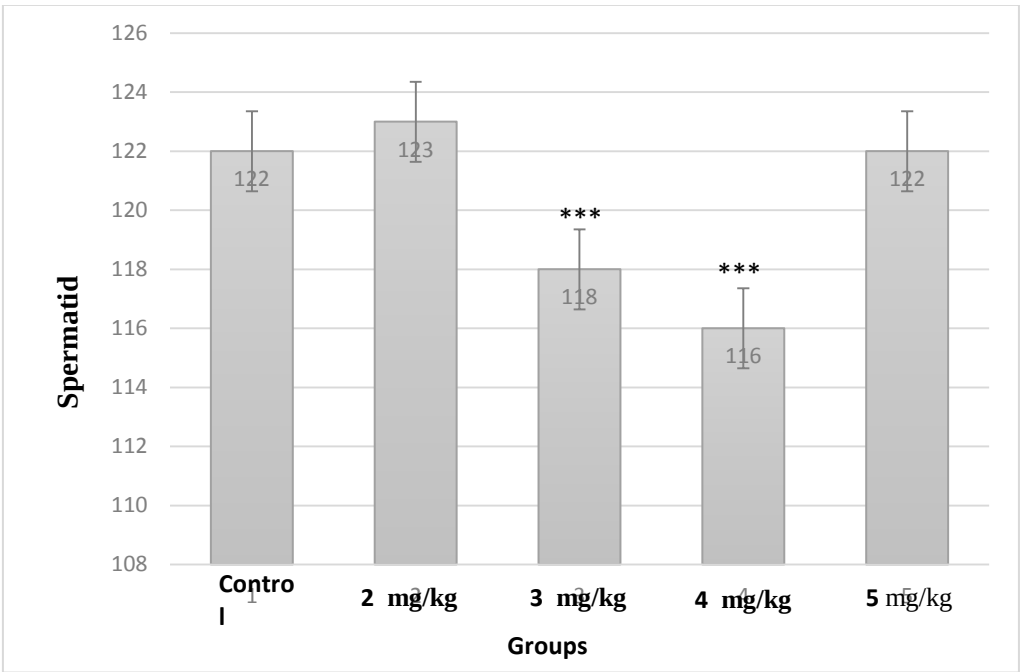
Fig 2. Comparison of the number of spermatogonial cells in different groups. The values indicate the mean data ± standard error



نمودار ۳- مقایسه تعداد اسپرماتوسیت۱ در گروه‌های مختلف. مقادیر، مشخص کننده میانگین داده ها ± خطای معیار می‌باشد.

(*** $p < ۰/۰۰۱$)

Fig 3. Comparison of the number of spermatocytes in different groups. The values indicate the mean data ± standard error



نمودار ٤- مقایسه تعداد اسپرماتید در گروه‌های مختلف. مقادیر، مشخص کننده میانگین داده ها ± خطای معیار می‌باشد. ***

($p < ۰/۰۰۱$)

Fig 4. Comparison of the number of spermatids in different groups. The values indicate the mean data ± standard error

بحث

از آنجا که اظطراب (۱۶) و افسردگی در سالهای اخیر شایع شده است و از طرفی استفاده از گروه داروهای بنزودیازپین ها مانند آلپرازولام، کلونازپام، تمازپام و لورازپام، دیازپام (۳) فلورازپام و کلرودیازپوکساید بعلت اثرات آرام بخشی، شل کننده عضلانی، ضد اضطرابی (۱۵) و ضد حملات پانیک متداول شده است (۱۸). در مطالعه حاضر اثر داروی دیازپام بر سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و سرتولی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج بدست آمده درگروه‌های تیمار شده با دوزهای تزریقی ۲ و ۳ میلی‌گرم بر میلی لیتر تعداد سلول های سرتولی نسبت به گروه کنترل کاهش معنا داری دارد و تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در دوز ۳ میلی‌گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه کنترل کاهش معنا داری دارد. در گروه‌های تیمار شده با دوزی تزریقی۳ و ٤ میلی‌گرم بر میلی لیتر تعداد سلول های اسپرماتید و اسپرماتوسیت اولیه نسبت به گروه کنترل کاهش معنا داری دارد. برای شروع اسپرماتوژنز هم هورمون محرکه فولیکولی و هم تستوسترون ضروری است. اسپرم ها در داخل مجرای لوله منی ساز آزاد شده و به سوی مجرای وابران اسپرم و سپس اپی دیدیم منتقل می شوند .اسپرم ها قادر به حرکت هستند و از میان مجرای دفران به طرف پیشابراه حرکت می کنند، ولی مکانیسم فیزیولوژیکی تنظیم حرکت آن ها تاکنون به طور کامل مشخص نشده است (۱۲). تمامی فرایندهای اسپرماتوژنز (اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و اسپرماتوزوا) تقریباً ۷۵ روز به طول می انجامد .اسپرماتوژنز از آغاز بلوغ جنسی فرد شروع می شود و تا پایان عمر ادامه می یابد ، فقط میزان آن بعد از ۵۰ سالگی اندکی کاهش می یابد علاوه بر هورمون‌های جنسی، برخی عوامل شامل عامل رشد، عوامل آزادکننده هیپوتالاموسی و سیتوکین ها نیز در تنظیم اسپرماتوژنز نقش دارند. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان گفت که تاثیر داروی دیازپام با دوز تزریقی ۳ میلی گرم بر میلی لیتر بر روند اسپرماتوژنز در پارامترهای تعداد اسپرماتوگنی، سلول های سرتولی و اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید اثر کاهشی داشته است. از آنجاییکه بنزودیازپین‌ها از جمله دیازپام می‌توانند با تسهیل ورود یون کلر و یا افزایش عمل گاما آمینوبوتیریک اسید باعث کاهش تحریک پذیری سلول‌ها شوند (۲۰) لذا احتمالا می‌توانند از همین طریق باعث کاهش روند اسپرماتوژنز شوند همچنین مطالعات Rittmaster و همکاران نشان داد که تغییر در ساختار و تعداد سلول های بیضه مو ش ها ی صحرایی می تواند در نتیجه اثرات ضد تکثیری و مرگ سلولی ناشی از مصرف فیناسترید در این حیوانات باشدکه با نتایج یافته‌های این پژوهش برای مصرف دیازپام همخوانی دارد(۱۸). مطالعات نشان می دهند که مصرف دیازپام باعث افزایش غلظت تستوسترون (۹) و همچنین کاهش تعداد گیرنده های آندروژنی در مغز و پروستات می شود بنابراین احتمالاً اثر تحریکی تستوسترون بر هسته های هیپوتالاموس و سلول های هیپوفیز قدامی کاهش می یابد؛ در نتیجه تولید آنزیم استیل کولین ترانسفراز، تعداد گیرنده های دوپامین نیز کاهش می یابد اما احتمالاً ترشح گابا (۱۰) می تواند باعث افزایش پرولاکتین شود . از آن جا که افزایش پرولاکتین باعث کاهش فعالیت و تقسیم در سلول های اپتیلیال بیضه می شود (۷)؛ بنابراین کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت اولیه قابل توجیه است که هم راستا با مطالعه حاضر است. از طرفی تستوسترون به عنوان مهم ترین هورمون آندروژن ، در تکامل و تکثیر سلول‌های ژرمینال و تمایز اسپرماتیدهای گرد به اسپرماتیدهای کشیده، نقش اساسی را ایفا می‌کند (۱۷) و مصرف داروهای آرام-

بخش مانند دیازپام می‌تواند با مهار محور هیپوتالاموس - هیپوفیز- گناد مانع ترشح کافی تستوسترون گردد (۱۳) و از عمل آن برای پیشبرد اسپرماتوژنز ممانعت نماید بنابراین مکانیسم موثر بعدی برای کاهش تعداد سلول‌ها می‌تواند این اثر باشد. مطالعات اندکی در این حوزه انجام شده است و درک چرایی تغییرات اتفاق افتاده نیازمند تحقیقات بیشتر است.

نتیجه‌گیری

در نهایت با توجه به نتایج فوق می‌توان گفت که تاثیر داروی دیازپام با دوز تزریقی ۳ میلی‌گرم/کیلوگرم بر روند اسپرماتوژنز و تعداد سلول‌های اسپرماتوگنی، تعداد سلول های سرتولی و اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید اثر کاهشی داشته است. احتمالا با افزایش طول دوره درمان و یا آزمون سایر دوزها بتوان دقیق تر نسبت به اثرات جانبی این دارو اظهار نظر کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان نامه با عنوان بررسی اثر داروی دیازپام بر روند اسپرماتوژنز در رت نر مصوب دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد واحد مشهد می‌باشد و نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی واحد کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1. Fernandez- Guasti A., Martinez – Mota, L. 2003. Orchidectomy sensitizes male rats to the action of diazepam on burying behavior latency: role of testosterone. *Pharmacol Biochem Behav*,75(2):473-9.

2. Fernandez –Guasti A., del Rio Portilla IY., Ugalde E., Corsi – Cabrera M. 2003.Diazepam and progesterone produce sexually dimorphic actions on the rat EEG: role of the neonatal sexual differentiation process. *Psycho neuroendocrinology*,28(1):85-100.

3. Fernandez – Guasti A., Reyes R., Martinez – Mota L., Lopez-Munoz FJ. 2005. Influence of inflammatory nociception on the anxiolytic- like effect of diazepam and buspirone in rats. *Psycho neuroendocrinology*, 180(3):399-407.

4. Ferreri MC., Gutierrez M.L. Gravielle Mc. 2015. Tolerance to the sedative and anxiolytic effects of diazepam is associated with different alterations of GABAA receptors in rat cerebral cortex. *Neuroscience*,310:152-62.

5. George F.W., Johnson L., Wilson J.D. 1989. The Effect of a 5 alpha-reductase inhibitor on androgen physiology in the immature male rat. *Endocrinology*,125:2434- 8.

6. Gong W., Liu S., Xu P., Fan M., Xue M. 2015. Simultaneous Quantification of Diazepam and Dexamethasone in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry and Its Application to a Pharmacokinetic Comparison between Normoxid and Hypoxic Rats. *Molecules*, 20(4):6901-12.

7. Huynh H., seyam R.M., Brock G.B. 1998. Reduction of ventral prostate weight by finasteride is associated with suppression of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-I receptor genes and with an increase in IGF binding protein 3. *Cancer Res*, 58(2):215-8.

8. Horii Y., Kawaguchi M. 2015. Higher detection sensitivity of anxiolytic effects of diazepam by ledge-free open arm with opaque walled closed arm elevated plus maze in male rats. *Behav Brain Res*, 294:131-40.

9. Kolasa A., Marchlewicz M., wenda-Różewicka L., Wiszniewska B.2004. Morphology of the testis and the epididymis in rats with dihydrotestosterone(DHT) deficiency. *Ann Acad Med Bial*, 49(1):117-9.

10. Koek W., Carter L.P., Lamb R.J., Chen W., Wu H., Coop A., France C.P. 2005.

Discriminative stimulus effects of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in rats discriminating GHB form baclofen and diazepam. *J Pharmacol Exp Ther*, 314 (1):170-9.

11. Leite I.S., Castelhano A.S., Cysneiros RM. 2016. Effect of diazepam on sociability of rats submitted to neonatal seizures. *Data Brief*,7:686-91.

12. McLachlan R.I., O'Donnell L., Meachem S.J. 2002. Stanton tification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res*,.57:149-79.

13. McNeilly A.S., Sharpe R.M., Davidson D.W., Fraser H.M. 1978. Inhibition of gonadotropin seretion by induced hyperprolactinemia in the male rat. *J Endocrinol*, 79;59-68.

14.Ovrerstreet J.W., Fuh V.L., Gould J., Howards S.S., Lieber M.M., Hellstrom J., et al. 1999.Chronic treatment with finasteride daily dose not affect spermatogenesis or semen production in young men. *J Urol*, 162(4): 1295- 300.

15.O'Connor K.A., Feustel P.J., Ramirez-Zamora A., Molho E., Pilitsis J.G., Shin D.S. 2016. Investigation of diazepam efficacy on anxiety-like behavior in hemiparkinsonian rats. *Behav Brain Res*,301:226-37.

16.Orzelska-Gorka J., Talarek S., Listos J., Kedzierska E., Fidecka S. 2016. L-NAME differential effects on diazepam and flunitrazepam responses of rats in the object recognition test. *Pharmacol Rep*, 68(4):728-32.

17. O'Donnell L., Stanton P.G., Wreford N.G., Robertson D.M., McLachlan R.I. 1996. Inhibition of 5 alpha-reductase activity impairs the testosterone-dependent restoration of spermiogenesis in adult rats. *Endocrinology*, 137:2703-10

18. Rittmaster R.S., Norman R.W., Thomas L.N., Rowden G.1996. Evidence for atrophy and apoptosis in the prostates of men given finasteride. *J Clin Endocrinol Metab*, 1:814-819.

۱۹. Tehranipour M., Javadmoosavi Z. 2011.The neuroprotective effect of alcoholic extract of cannabis sativa on neuronal density of spinal cord alpha motoneurons after sciatic nerve injury in rat. *j shaheed sadoughi uni med sci*, 19(3). 49-339.

۲۰.Tobin V.A, Canny B.J. 1998.The regulation of gonadotropin releasing hormone induced calcium signals in male rat gonadotrophs by testosterone is mediated by dihydro testosterone. *Endocrinology*,139(3):1038-45.