ORIGINAL ARTICLE

The Effects of Hydro-alcoholic Extract of Achillea millefolium on Sperm Parameters and Apoptotic Changes in Cyclophosphamide Treated Mice

Neda Asleiranifam[1],
Shapour Hasanzadeh[2],
Mohammad Reza Sam[3],
Gholam Reza Najafi Tazehkand[4]

[1] PhD Candidate, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
[2] Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

(Received June 22, 2015 Accepted October 31, 2015)

Abstract

Background and purpose: Cyclophosphamide (CP) is a chemotherapy drug extensively used as an antineoplastic agent in treatment of various cancers. However, it is known to cause several adverse effects including reproductive toxicity. *Achillea millefolium* (AM) is a medicinal plant with potential antioxidant properties. The aim of this investigation was to evaluate the effects of different doses of AM extract on body weight, sperm parameters, and apoptotic changes in CP treated mice.

Materials and methods: Sixty four male NMRI mice were arranged into 8 groups. Group1 received normal saline, and groups 2, 3 and 4 received AM extract in low, medium and high doses, respectively. Group 5 received CP and groups 6, 7 and 8 had low, medium and high doses of *Achillea millefolium* extract, respectively plus CP. Treatments were continued for 35 days. Afterwards, the animals' weight, sperm quality and apoptosis rate were evaluated.

Results: CP decreased body weight and testicular weight, imposed negative effects on sperm parameters and increased sperm apoptosis compared to the control group. The high-dose of AM produced deleterious effects. Medium doses of the extract did not show any significant effect, but low dose of the extract was able to compensate the toxic effects of CP.

Conclusion: In this study, AM had dose-dependent manner. In other words, at low dose it prevented CP toxicity, in medium dose it had no effect, but in high dose it improved CP toxicity.

Keywords: *Achillea millefolium*, apoptotic changes**,** cyclophosphamide, sperm parameters, mice

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(133): 77-90 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۳۳ بهمن سال ۱۳۹۴ (۹۰-۷۷)

اثرات عصاره هیدروالکلی گل بومادران بر روی پارامترهای اسپرمی و تغییرات آپوپتوزی متعاقب استفاده از داروی سیکلوفسفامید در موش های سفید کوچک آزمایشگاهی

ندا اصل ایرانیفام[۱]
شاپور حسن زاده[۲]
محمد رضا سام[۳]
غلامرضا نجفی تازه کند[۴]

چکیده

سابقه و هدف: سیکلوفسفامید (یک داروی شیمی درمانی با اثرات سوء فراوان بر ارگان‌های جنسی) به عنوان یک عامل نئوپلاستیک به طور گسترده در درمان سرطان‌های مختلف استفاده می‌شود. از طرفی، سیکلوفسفامید عامل اثرات سوء فراوان از جمله سمیت تولید مثلی شناخته شده است. بومادران گیاه دارویی با خواص آنتی‌اکسیدانتی بالقوه است. هدف از انجام این تحقیق بررسی اثرات عصاره بومادران در سه دوز مختلف بر وزن بدن، پارامترهای اسپرم و تغییرات آپوپتوزی در موش های تحت تیمار با سیکلوفسفامید بود.

مواد و روش‌ها: ۶۴ موش سفید کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI به هشت گروه تقسیم شدند. گروه اول سرم فیزیولوژی، گروه دوم، سوم و چهارم به ترتیب دوز کم، متوسط و زیاد بومادران، گروه پنجم سیکلوفسفامید و گروه ششم، هفتم و هشتم، علاوه بر سیکلوفسفامید، دوز کم، متوسط و زیاد بومادران را به ترتیب دریافت نمودند. تیمار ۳۵ روز ادامه داشت. در پایان پس از تعیین وزن، پارامترهای کیفیت اسپرم و میزان آپوپتوز اسپرمی بررسی گردید.

یافته‌ها: سیکلوفسفامید سبب کاهش وزن بدن و بیضه شده، تأثیر منفی بر روی پارامترهای اسپرمی اعمال نموده و هم‌چنین میزان آپوپتوز اسپرمی (در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید) را در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد. دوز زیاد بومادران نیز اثرات توکسیک داشته، دوز متوسط عصاره تأثیر معنی داری نداشته، اما دوز کم عصاره توانست اثرات سمی سیکلوفسفامید را جبران نماید.

استنتاج: در این مطالعه اثرات عصاره بومادران به صورت وابسته به دوز بود، به نحوی که در دوز کم سمیت سیکلوفسفامید را جبران نموده، در دوز متوسط تأثیر معنی‌داری نداشته اما در دوز بالا افزایش دهنده سمیت سیکلوفسفامید بود.

واژه های کلیدی: بومادران، تغییرات آپوپتوزی، سیکلوفسفامید، پارامترهای اسپرمی، موش سوری

مقدمه

در عصر حاضر از داروهای شیمی‌درمانی به‌طور گسترده در درمان بیماران مبتلا به سرطان استفاده می‌شود. از آن‌جایی که این داروها بر روی تقسیم سلولی سلول‌هایی که سرعت تقسیم بالایی دارند مانند

مولف مسئول: شاپور حسن زاده– ارومیه: دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه E-mail: s.hasanzadeh@urmia.ac.ir
۱. دانشجوی PhD بافت شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲. دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳. استادیار، گروه زیست فناوری سلولی و مولکولی، پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۴. استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۴/۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۴/۲۰ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۸/۹

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

سلول‌های جنسی اثر بیش‌تری می‌گذارند(۱) مصرف این داروها می‌تواند توأم با اختلالات باروری باشد(۲). دراین میان، عوامل شیمی درمانی با خاصیت آلکیله کنندگی بیش‌ترین آثار سوء را بر ارگان‌های جنسی دارند(۳) که سیکلوفسفامید از جمله این داروها است. این دارو در سال ۱۹۵۸ سنتز شده(۴) و در درمان سرطان‌های مختلف، لوسمی حاد و مزمن، لنفوم‌های بدخیم و بیماری‌های خود ایمنی مثل آرتریت روماتوئید به شکل گسترده‌ای استفاده می‌شود(۵). این دارو ضمن تخریب سلول‌های سرطانی و مهار آن‌ها، با تولید رادیکال‌های آزاد قادر به ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت‌ها می‌باشد و علی‌رغم کاربردهای کلینیکی فراوان اثرات مخربی را در موجوداتی که در معرض این دارو قرار می‌گیرند، ایجاد می‌نماید(۶). برخی از اثرات جانبی معمول سیکلوفسفامید عبارت است از: سرکوب مغز استخوان، استفراغ، ریزش مو، سیستیت هموراژیک و ناباروری(۷). سیکلوفسفامید در محیط خارج از بدن غیرفعال بوده و در داخل بدن در کبد توسط آنزیم سیتوکروم P۴۵۰ به ۴- هیدروکسی سیکلوفسفامید تبدیل می‌شود که با توتومر خود یعنی آلدوفسفامید در تعادل می‌باشد. آلدوفسفامید به طور خود به خود تجزیه شده و به متابولیت‌های فعال یعنی فسفورآمیدموستارد (Phosphorus amide mustard) و آکرولین (Acrolein) تبدیل می‌شود(۹،۸). فسفورآمید موستارد متابولیت سیتوتوکسیک سیکلوفسفامید محسوب شده و با تخریب DNA سلول‌های در حال تقسیم روند آپوپتوز را در این سلول‌ها تسریع می‌نماید(۱۰). این در حالی است که آکرولین به واسطه تضعیف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی بافت‌ها (۱۱) و نیز تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (۱۲)، موجبات بروز استرس اکسیداتیو و انواع آسیب‌های سلولی از جمله آپوپتوز و نکروز را فراهم می‌آورد(۱۴،۱۳). آپوپتوز، نوعی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، می‌تواند در تمام مراحل زندگی و در همه سلول‌های بدن و از جمله سلول‌های زایای بیضه رخ دهد. بیضه‌ها نسبت به سموم محیطی که منجر به آسیب سلولی می‌شوند، حساس هستند. بنابراین، کنترل پدیده آپوپتوز جهت برقراری اسپرماتوژنز طبیعی در بزرگسالان بسیار مهم است(۱۵). با توجه به مطالب مذکور، به کارگیری استراتژی‌هایی جهت کاهش عوارض جانبی داروی سیکلوفسفامید با حفظ اثرات درمانی آن ضروری به نظر می‌رسد(۱۶). بومادران با نام علمی Achillea millefolium متعلق به راسته آستراسه (Asteraces) و تیره کاسنی می‌باشد. در کشور ما هفت گونه از این گیاه در مناطق آذربایجان، گیلان، گلستان و خراسان وجود دارد(۱۸،۱۷). بخش‌های مورد استفاده گیاه سرشاخه‌های گلدار آن است که طعم تلخ و بوی قوی دارند(۱۷). در طب سنتی و طب مدرن استفاده‌های گوناگونی برای گیاه بومادران ذکر شده است. از جمله موارد استفاده کلینیکی این گیاه توقف رشد و تخریب سلول‌های سرطانی است(۱۹). بیش از صد ترکیب بیولوژیک فعال در این گیاه شناسایی شده است که مهم‌ترین آن‌ها روغن فرار، ترکیبات پلی فنلی، انواع فلاونوئیدها، سسکویی‌ترپن (Sesquiterpene)، لاکتون، بتایین، ترکیبات استیلن، رزین، تانن، آشیلین، فسفات، نیترات، نمک‌های پتاسیم و اسیدهای آلی هستند(۲۰). این گیاه ویژگی ضد آپوپتوزی داشته(۲۱) و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی آن نتیجه عملکرد ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها است(۲۲). در مطالعات قبلی تأثیر مثبت عصاره گل بومادران بر روی سلول‌های سرطانی و خاصیت ضد ادم و ضد التهابی آن به سسکویی‌ترپن‌های موجود در این گیاه نسبت داده شده است(۲۴،۲۳). در رابطه با تأثیر این گیاه بر روی سیستم تولید مثلی نتایج ضد و نقیضی در دسترس است. براساس مطالعه اکبری زاده و همکاران (۲۰۱۳)، عصاره آبی گیاه بومادران به سبب دارا بودن ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه سبب افزایش کیفیت اسپرم در رت‌های تحت تیمار با داروی سیکلوسپورین می‌شود(۲۵). با این وجود، سایر محققان نشان داده‌اند که عصاره گل بومادران دارای اثر آنتی اسپرماتوژنیک است(۲۷،۲۶). لذا در این تحقیق

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

اثرات عصاره هیدروالکلی گل بومادران در سه دوز مختلف و سیکلوفسفامید بر روی تغییرات پارامترهای اسپرمی و تغییرات آپوپتوزی که شاخص‌های مهمی برای باروری جنس نر بوده و می‌تواند اطلاعات مفیدی در ارتباط با پتانسیل باروری حیوانات ارائه دهند، بررسی شد.

مواد و روش ها

۱. طرز تهیه عصاره هیدروالکلی بومادران

گیاه بومادران پس از شناسایی علمی توسط اساتید گیاه شناسی دانشکده علوم با هرباریوم نامبر ۷۵۱۹، از استان آذربایجان غربی و اطراف شهر ارومیه در فصل گلدهی جمع‌آوری شد. گل‌های گیاه پس از جداسازی، در اتاق تاریک با دمای ۲۵ الی ۳۰ درجه سانتی‌گراد خشک و توسط آسیاب برقی خرد گردید. سپس با اتانول ۷۰ درصد مخلوط و به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سوسپانسیون حاصله با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردیده و محلول زیرصافی در دستگاه تقطیر خلأ (Rotatory Evaporator) در دمای ۴۰°C به میزان ۱/۱۲ حجم اولیه تغلیظ گردید و پس از خشک‌شدن و توزین عصاره‌ها، درصد عصاره‌ها محاسبه و در دمای ۲۰°C- نگهداری شد و در مواقع مصرف با آب مقطر رقیق گردیده و مورد استفاده قرار گرفت(۲۹،۲۸). دوزی از عصاره که در ۵۰ درصد حیوانات مورد مطالعه اثر کشندگی داشته باشد (LD50)، ۳ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن محاسبه گردید.

۲. ارزیابی میزان ترکیبات فنلی عصاره

جهت اندازه گیری محتوای تام فنلی عصاره از معرف فولین سیوکالتیو استفاده گردید. بدین ترتیب که ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر فولین سیو کالتیو ۰/۲ نرمال به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره اضافه شد و پس از ۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم (۷۵ گرم بر لیتر) به آن اضافه گردید. پس ازگذشت ۲ ساعت جذب این مخلوط توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت شد. جهت رسم منحنی کالیبراسیون از اسید گالیک به عنوان استاندارد استفاده شد. میزان تام فنولیک براساس میزان معادل " میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره " گزارش گردید(۳۰).

۳. ارزیابی میزان ترکیبات فلاونوئیدی عصاره

جهت اندازه‌گیری محتوای تام فلاونوئیدی از معرف کلرید آلومینیوم استفاده شد. بدین ترتیب که به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره بومادران، ۱/۵ میلی لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. پس از گذشت نیم ساعت جذب این مخلوط توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت شد. جهت رسم منحنی کالیبراسیون از کوئرستین به عنوان استاندارد استفاده شد. میزان فلاونوئید براساس میزان معادل "میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره" گزارش گردید(۳۱).

۴. حیوانات مورد آزمایش

در این تحقیق ۶۴ قطعه موش سفید کوچک آزمایشگاهی نرنژاد (National Medical Research Institute) NMRI با میانگین سنی ۸-۷ هفته مورد مطالعه قرار گرفتند. حیوانات در شرایط مناسب با دمای ۲۵°C-۲۰، دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی/ ۱۲ ساعت تاریکی پرورش و نگهداری شدند. در طول دوره تیمار، حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشته و شرایط پرورش برای تمامی حیوانات یکسان بود. هم‌چنین اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی براساس ضوابط دانشگاه ارومیه رعایت گردید.

۵. گروه بندی حیوانات

موش‌ها پس از یک هفته انطباق با محیط مرکز نگهداری حیوانات به‌طور تصادفی در هشت گروه ۸ تایی تقسیم‌بندی شدند. حیوانات گروه اول به عنوان کنترل در نظر گرفته شده و ۰/۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

به صورت گاواژ دریافت نمودند. گروه دو، سه و چهار به ترتیب ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (دوز کم)، ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (دوز متوسط) و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (دوز زیاد) عصاره بومادران را به صورت گاواژ دریافت نمودند(۳۲). گروه پنجم ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم سیکلوفسفامید(۳۳) به صورت گاواژ دریافت نمودند. گروه شش، هفت و هشت، همراه با ۵ گرم بر کیلوگرم سیکلوفسفامید به صورت گاواژ، به ترتیب ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره بومادران را به صورت گاواژ و با فاصله یک ساعت از سیکلوفسفامید دریافت نمودند. تیمار به صورت روزانه و به مدت ۳۵ روز برای تمامی گروه‌ها ادامه داشت. یک روز پس از پایان تیمار، موش‌ها توزین شده، سپس با اتر بیهوشی عمیق گرفته و به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی آسان‌کشی شدند. پس از کالبد گشایی، بیضه و دم اپیدیدیم با رعایت اصول استریل برداشته شدند. بیضه‌ها متعاقب جداسازی بافت‌های اطراف، با استفاده از ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن گردیدند.

۶. آماده سازی اسپرم

به منظور خارج شدن اسپرم‌ها، دم اپیدیدیم‌ها به قطعات کوچک بریده شده و به داخل لوله فالکون‌های استریل حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت HTF (Human Tubular Fluid) منتقل شدند. سپس لوله فالکون‌ها در انکوباتور CO_2 ۵ درصد با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند تا اسپرم‌های موجود در آن‌ها آزاد شده و وارد محیط کشت شوند(۳۴).

۷. ارزیابی حرکت اسپرم

برای ارزیابی حرکت اسپرم، ۱ قطره از اسپرم‌های موجود درمحیط کشت را روی یک اسلاید میکروسکوپی چکانده، سپس روی هر کدام یک لامل قرار داده، درهر حیوان حداقل ۵ میدان دید میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر مطالعه و درصد اسپرم‌های متحرک در تمامی گروه‌ها مشخص شدند(۳۵).

۸. ارزیابی زنده بودن اسپرم

برای ارزیابی درصد اسپرم‌های زنده از رنگ آمیزی ائوزین نگروزین استفاده شد. بدین منظور یک قطره از محیط کشت حاوی اسپرم روی یک لام قرار داده شد و به آن رنگ ائوزین- نگروزین اضافه گردید. اگر اسپرم زمان رنگ‌آمیزی زنده باشد، رنگ به داخل سر و تنه نفوذ نکرده و به رنگ روشن (سفید) دیده می‌شود در حالی که در اسپرم‌های مرده رنگ به داخل اسپرم نفوذ کرده و به خود رنگ گرفته، به رنگ صورتی مشاهده می‌شوند(۳۶).

۹. ارزیابی کیفیت کروماتین اسپرم

جهت بررسی کیفیت کروماتین اسپرم‌ها از رنگ‌آمیزی آکریدین اورانج استفاده شد. این رنگ‌آمیزی برای تفریق DNA سالم و دورشته ای از DNA دناتوره شده تک رشته‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. اسپرم‌ها با DNA سالم بعد از رنگ‌آمیزی در زیر میکروسکوپ فلورسنت به رنگ سبز دیده می‌شوند در حالی که اسپرم‌ها با DNA آسیب دیده به رنگ نارنجی تا قرمز دیده می‌شوند. اسمیرها با استفاده از محلول کارنوی به مدت ۲ ساعت در هوای آزمایشگاه فیکس شدند. سپس اسمیرها توسط رنگ آکریدین اورنج تازه تهیه شده در بافر سیترات فسفات (۰/۱۹ گرم پودر آکریدین اورنج در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر سیترات فسفات) به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شده و در زیر میکروسکوپ فلورسنت مورد ارزیابی قرار گرفتند(۳۷).

۱۰. ارزیابی تعداد کل اسپرم در هر میلی‌لیتر محیط کشت

مطابق روش‌های استاندارد و رایج در مطالعات مشابه، ابتدا رقت ۱ به ۲۰ از اسپرم‌های به دست آمده از دم اپیدیدیم تهیه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده بر روی لام نئوبار منتقل شده، با لامل پوشانده شده

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

و پس از گذشت چند دقیقه و بی‌حرکت شدن اسپرم‌ها، اسپرم‌ها شمارش شده و با استفاده از فرمول زیر تعداد اسپرم‌ها به دست آمد(۳۸):

عکس رقت×۵۰۰۰۰× تعداد اسپرم در۵ خانه=تعداد اسپرم درهر میلی‌لیتر ازمحیط کشت

۱۱. ارزیابی اسپرم‌های آپوپتوتیک

سلول‌های آپوپتوتیک یکسری سیگنال از خود نشان می‌دهند که منجر به شناسایی و بلعیده شدن آن‌ها توسط ماکروفاژها می‌گردد(۳۹). از جمله این سیگنال‌ها می‌توان به جابه‌جایی فسفاتیدیل سرین از سطح داخلی غشا به سطح خارجی آن اشاره نمود(۴۰). در این مطالعه جهت ردیابی فسفاتیدیل سرین از کیت شناساگر آپوپتوز شرکت Biosciences با نام تجاری Annexin V- FITC Apoptosis Detection (BD Biosciences, Pharmingen, SanDiego, USA) استفاده گردید. پروتئین آنکسین V در حضور کلسیم با میل ترکیبی بالایی توانایی اتصال به این فسفولیپید را داشته و می‌تواند به عنوان یک شاخص جهت شناسایی سلول‌های آپوپتوتیک به کار رود(۴۱). در این مطالعه، رنگ‌آمیزی اسپرم‌ها با آنکسین V امکان جداسازی اسپرم‌های سالم از انواع اسپرم‌های آپوپتوتیک را میسر نمود. بدین‌منظور نمونه محتوی ۱×۱۰^{۶} اسپرماتوزوئید به مدت ۶ دقیقه در۵۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید و در حجم یکسان با بافر Annexin V binding buffer مخلوط گشته، پس از چند ثانیه محلول فوق در ۱۰۰ میکرولیتر از محلول Isothiocyanate Annexin V/ fluorescein مخلوط گشته و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس رنگ‌آمیزی آنکسین V صورت گرفته و نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت در طول موج ۴۸۸nm مورد ارزیابی قرار گرفتند. اسپرم‌ها با غشاء آسیب دیده به رنگ سبز مشاهده شدند در حالی که اسپرم‌های غیر آپوپتیک رنگ نگرفته بودند. تعداد اسپرم آنکسین V مثبت به ازای هر ۱۰۰ اسپرم تعریف گردید(۴۲).

آنالیز آماری

به منظور مقایسه آماری، یافته‌ها با استفاده از نسخه ۲۱ نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شده و برای آنالیز داده‌ها از آزمون یک‌طرفه ANOVA و تست تعقیبی Tukey استفاده شد. یافته‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده و مقادیر $p<۰/۰۵$ و کم‌تر از آن معنی‌دار تلقی شدند.

یافته ها

نتایج به دست آمده در مراحل مختلف ارزیابی در جداول شماره ۱ تا ۳ آورده شده و به تفکیک به شرح زیر می‌باشد:

۱. میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عصاره. *براساس* نتایج آزمایش‌های اندازه‌گیری ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی این ترکیبات در عصاره هیدروالکلی بومادران با مقادیر زیاد وجود داشت (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: میزان ترکیبات فنلی بر حسب میلی‌گرم اسیدگالیک در گرم عصاره و میزان ترکیبات فلاونوئیدی بر حسب میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره هیدروالکلی بومادران

عصاره	ترکیبات فنلی (mg/g)	ترکیبات فلاونوئیدی(mg/g)
هیدروالکلی بومادران	۱۴۷/۲۵±۲/۵	۴۳/۶۷±۱/۵

۲. اثر بر وزن بدن و وزن بیضه

با توجه به نتایج به دست آمده از آزمون‌های آماری، وزن بدن و وزن بیضه در گروه‌های دوم و سوم اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نداشت. در گروه چهارم، وزن بیضه در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p <۰/۰۵$). در گروه پنجم، کاهش قابل توجه وزن بیضه در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت ($p <۰/۰۰۱$) به نحوی که این کاهش حتی نسبت به گروه چهارم نیز معنی‌دار بود ($p <۰/۰۵$). در این گروه وزن بدن نیز به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود ($p <۰/۰۵$). در گروه ششم با مصرف همزمان سیکلوفسفامید و دوز کم عصاره، این کاهش وزن بدن و بیضه جبران شد که فاقد اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل بودند. در گروه هفتم مصرف همزمان سیکلوفسفامید و دوز متوسط عصاره، وزن بدن را جبران نمود ولی تأثیر معنی‌داری روی وزن بیضه

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

نداشت و اختلاف معنی‌دار با گروه‌کنترل داشت($p<۰/۰۱$). در گروه هشتم نیز در اثر مصرف توأم سیکلوفسفامید و دوز زیاد عصاره، کاهش وزن بدن و بیضه جبران نشده و در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بودند ($p <۰/۰۰۱$) (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: مقایسه اثرات عصاره هیدروالکلی بومادران در سه دوز مختلف و سیکلوفسفامید بر وزن بدن (بر حسب گرم) و بیضه (برحسب میلی گرم) در گروه های مورد مطالعه

گروه ها	وزن بدن (gr)	وزن بیضه (mg)
کنترل	۳۴/۶۷±۰/۷۳	۱۱۵±۰/۵۸
بومادران(Low dose)	۳۵/۵±۰/۳	۱۱۶±۱
بومادران(Medium dose)	۳۴/۸۳±۱/۱	۱۱۵±۱
بومادران(High dose)	۳۳/۸۳±۰/۳۳	۱۱۰/۳۳±۰/۳۳*
سیکلوفسفامید	۳۱/۵±۰/۳*	۱۰۵/۳۳±۱***
سیکلوفسفامید+بومادران(Low dose)	۳۴±۰/۳	۱۱۲±۰/۵۸
سیکلوفسفامید+بومادران(Medium dose)	۳۳±۰/۸	۱۰۸/۳۳±۱**
سیکلوفسفامید+بومادران(High dose)	۳۰/۸۳±۰/۳۳**	۱۰۳±۱/۱۵***

* $p<۰/۰۵$، ** $p<۰/۰۱$ و *** $p<۰/۰۰۱$ (آزمون آنووای یکطرفه و تست توکی).

۳. ارزیابی تعداد اسپرم ها

مصرف عصاره بومادران به تنهایی و در دوزهای کم و متوسط اگر چه تعداد اسپرم‌ها را افزایش داد ولی این افزایش نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود. در گروه پنجم تعداد اسپرم‌ها در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p <۰/۰۰۱$). تعداد اسپرم‌ها در اثر مصرف همزمان سیکلوفسفامید با دوز کم عصاره تا حد زیادی افزایش یافت به نحوی که اختلاف معنی‌داری با گروه پنجم داشت ($p <۰/۰۰۱$) اما نتوانست تا حد گروه کنترل جبران شود و اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل داشت ($p <۰/۰۵$). مصرف همزمان سیکلوفسفامید با دوز متوسط عصاره نتوانست تعداد اسپرم‌ها را تا حد معنی‌داری افزایش دهد و در گروه هشتم، برعکس تعداد اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($p <۰/۰۰۱$) که البته نسبت به گروه پنجم معنی‌دار نبود (جدول شماره ۳).

۴. ارزیابی تحرک اسپرم ها

در این مطالعه، تحرک اسپرم‌ها در گروه‌های دوم و سوم تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشت. مصرف دوز زیاد عصاره سبب کاهش معنی‌دار در تحرک اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل شد ($p <۰/۰۰۱$). در گروه پنجم نیز تحرک اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل به صورت معنی‌دار کاهش یافت ($p <۰/۰۰۱$) که بامصرف توأم سیکلوفسفامید و دوز کم عصاره تا حد قابل توجهی جبران شده بود و اختلاف معنی‌داری با گروه پنجم نشان داد ($p<۰/۰۰۱$). مصرف سیکلوفسفامید به همراه دوز متوسط عصاره تأثیر معنی‌داری بر روی تحرک اسپرم‌ها نداشت و مصرف سیکلوفسفامید با دوز زیاد عصاره سبب کاهش درصد اسپرم‌های متحرک شد که البته در مقایسه با گروه پنجم معنی‌دار نبود (جدول شماره ۳).

۵. ارزیابی قابلیت زنده ماندن اسپرم ها

در گروه‌های دوم و سوم، افزایش تعداد اسپرم‌های زنده نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود، اما مصرف دوز زیاد عصاره سبب کاهش معنی‌دار اسپرم‌های زنده نسبت به گروه کنترل شد ($p <۰/۰۰۱$). در گروه پنجم نیز کاهش معنی‌دار در درصد اسپرم‌های زنده نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($p <۰/۰۰۱$). این کاهش در اثر مصرف همزمان سیکلوفسفامید با دوز کم عصاره جبران شده بود و اختلاف معنی‌داری با گروه پنجم داشت ($p <۰/۰۱$). مصرف دوز متوسط عصاره به همراه سیکلوفسفامید تأثیر معنی‌داری بر روی درصد زنده ماندن اسپرم‌ها نداشت و مصرف دوز زیاد عصاره همراه با سیکلوفسفامید سبب افزایش تعداد اسپرم‌های مرده شده بود که البته این اختلاف نسبت به گروه پنجم معنی‌دار نبود (جدول شماره ۳) (تصویر شماره ۱- الف).

۶. ارزیابی کیفیت DNA اسپرم ها

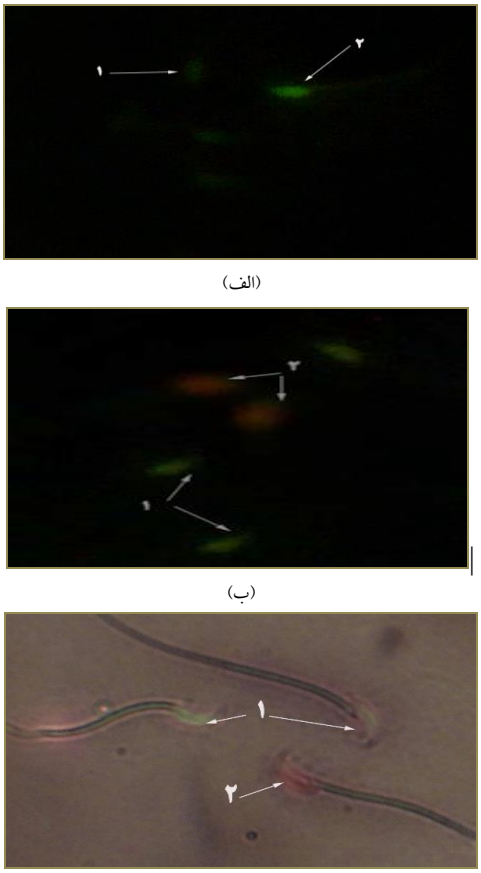
رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج در این مطالعه نشان داد که تعداد اسپرم ها با DNA آسیب دیده در گروه‌های دوم و سوم تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل ندارد. در گروه چهارم تعداد این اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

افزایش داشت ($p <$ ۰/۰۵). در گروه پنجم نیز تعداد اسپرم‌ها با DNA آسیب دیده نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($p <$ ۰/۰۰۱). در گروه ششم با دریافت همزمان سیکلوفسفامید و دوز کم عصاره کاهش معنی‌داری در درصد اسپرم‌ها با DNA آسیب دیده نسبت به گروه پنجم وجود داشت ($p <$ ۰/۰۱). برعکس تعداد اسپرم‌ها با DNA آسیب دیده در گروه هفتم نسبت به گروه پنجم افزایش نیز یافته بود که البته معنی‌دار نبود. در گروه هشتم با مصرف سیکلوفسفامید به همراه دوز زیاد عصاره تعداد این اسپرم‌ها به طور قابل توجهی افزایش یافته و اختلاف معنی‌دار با گروه پنجم داشت ($p <$ ۰/۰۵) (جدول شماره ۳) (تصویر شماره ۱- ب).

۷. *ارزیابی میزان آپوپتوز اسپرم‌ها*

در این بررسی میزان وقوع آپوپتوز در گروه‌های دوم، سوم و چهارم تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشت. در گروه پنجم تعداد اسپرم‌های آنکسین V مثبت در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافته بود ($p <$ ۰/۰۵) و با مصرف هم‌زمان سیکلوفسفامید با دوز کم عصاره میزان آپوپتوز القا شده در اسپرم‌ها تا حد گروه کنترل جبران شده بود به نحوی که تعداد اسپرم‌های آنکسین V مثبت کاهش معنی‌داری نسبت به گروه پنجم داشت ($p <$ ۰/۰۵). در اثر مصرف توأم سیکلوفسفامید و دوز متوسط عصاره القا آپوپتوز در اسپرم‌ها تشدید شده بود. این افزایش در گروه هشتم مشهودتر بود که البته در هیچ یک از آن‌ها اختلاف معنی‌داری با گروه پنجم نداشت (جدول شماره ۳) (تصویر شماره ۱- ج).



(الف)

(ب)

(ج)

تصویر شماره ۱: الف- تصویر میکروسکوپ نوری. در گروه کنترل اسپرم های زنده (۱) با سر روشن و رنگ نگرفته و اسپرم مرده با سر صورتی دیده می شود؛ ب- تصویر میکروسکوپ نور فلورسنت. در گروه کنترل اسپرم سالم (۱) با هسته ای به رنگ سبز و اسپرم با DNAآسیب دیده (۲) با هسته نارنجی دیده می شود؛ ج- تصویر میکروسکوپ نور فلورسنت. در گروه کنترل اسپرم سالم (۱) با هسته ای به رنگ سبز کم رنگ و مات و اسپرم آپوپتوتیک (۲) با هسته سبز پر رنگ و براق دیده می شود (بزرگ نمایی ×۱۰۰۰).

جدول شماره ۳: مقایسه اثرات عصاره هیدروالکلی بومادران در سه دوز مختلف و سیکلوفسفامید بر پارامترهای اسپرمی و تغییرات آپوپتوزی در گروه های مورد مطالعه

گروه ها	تعداد اسپرم (10^6/ml×)	تحرک‌اسپرم (٪)	زیست پذیری (٪)	آکریدین اورنج (٪)	درصد اسپرم های+Annexin-V
کنترل	۳۱/۵±۱/۱۵	۷۷/۶۷±۲/۳۳	۷۹±۲/۱	۱۸/۸۴±۲/۳۶	۲۰/۷۱±۱/۶۱
بومادران(Low dose)	۳۴/۱±۰/۳	۸۲/۳۳±۰/۸۸	۸۳±۱/۱۵	۱۱/۱۵±۰/۶	۱۲/۱۷±۱/۰۶
بومادران(Medium dose)	۳۲/۱۷±۰/۵۵	۷۸/۶۷±۲/۱۸	۸۰±۲/۱	۱۵/۸۸±۲/۱	۲۰/۶۱±۱/۲۴
بومادران(High dose)	۱۹/۶۷±۰/۶۸***	۳۴/۳۳±۱/۷۶***	۳۵±۲/۱***	۳۱/۹۴±۳/۷*	۲۶/۲۳±۲/۵۳
سیکلوفسفامید	۱۵±۱/۱۲***	۲۹±۱/۷۳***	۳۰±۲/۱***	۳۷/۵±۲/۴۱***	۳۳/۶۱±۲/۱۷*
سیکلوفسفامید+بومادران(Low dose)	۲۶/۶۷±۱/۰۱*	۵۲±۳***	۵۴±۲/۵۲***	۲۲/۴۱±۱/۴۵	۲۱/۵±۰/۸۹
سیکلوفسفامید+بومادران(Medium dose)	۱۷±۱/۱۳***	۳۱/۳۳±۳/۵۳***	۳۲±۳/۶۱***	۴۱/۷۷±۲/۵***	۳۰/۳۶±۳/۷۲
سیکلوفسفامید+بومادران(High dose)	۹/۱۷±۱/۳۴***	۱۵/۳۳±۱/۴۵***	۱۶±۲/۱***	۴۸/۷۲±۱/۳***	۴۰/۱۷±۳/۴۶***

* ۰/۰۵ >p، ** ۰/۰۱ >p و *** ۰/۰۰۱ >p (آزمون آنووای یکطرفه و تست توکی).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

بحث

عوارض سمی داروی سیکلوفسفامید بر روی بافت بیضه به واسطه تحقیقات متعدد در انسان و حیوانات آزمایشگاهی مورد تأیید قرار گرفته(۴۳،۶) و بی‌تردید مهم‌ترین عاملی است که به شدت کاربردهای درمانی این دارو را تحت تأثیر قرار داده است(۶). براساس نتایج مطالعه حاضر و نیز مطالعات پیشین(۴۴،۱۶)، تجویز داروی سیکلوفسفامید موجب کاهش معنی‌دار وزن بدن و بیضه موش‌ها می‌گردد. دلو و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه خود کاهش وزن ناشی از مصرف سیکلوفسفامید را سمیت ناشی از این دارو در کبد، کلیه و سایر ارگان‌ها گزارش نمودند(۴۴). از آن‌جاکه وزن بیضه به میزان زیادی به توده‌های سلولی تمایز یافته موجود در آن وابسته است، کاهش محسوس در وزن بیضه ناشی از داروی سیکلوفسفامید با دژنراسیون و کاهش تعداد سلول‌های زایا و میزان پایین اسپرماتوژنز در ارتباط می‌باشد(۴۵). بررسی‌های به عمل آمده در این مطالعه هم‌چنین آشکار ساخت که تجویز داروی سیکلوفسفامید کاهش معنی داری را در تعداد و میزان تحرک اسپرم‌ها و در عین حال افزایش معنی‌داری را در میزان اسپرم‌های مرده در پی دارد که این یافته‌ها نیز گزارشات قبلی در این زمینه را تأیید می‌کند(۴۷،۴۶). کاهش تعداد اسپرم‌ها متعاقب تجویز داروی سیکلوفسفامید به شکل واضحی مؤید کاهش سلول‌های اسپرماتوژنیک بوده و هجوم رادیکال‌های آزاد حاصل ازمتابولیسم داروی سیکلوفسفامید را خاطر نشان می‌سازد. در واقع آسیب اکسیداتیو اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دوگانه (PUFAs) غشاءهای سلولی موجب اختلال در سیالیت و نفوذپذیری غشاءهای سلولی می‌گردد که این امر می‌تواند موجب آسیب دیدگی سلول‌هایی نظیر سلول‌های زایای بیضه و اسپرم‌ها گردد(۴۸). براساس مطالعات پیشین، قدرت تحرک اسپرم‌ها به عنوان عامل تعیین‌کننده و مؤثر در باروری بوده و متضمن لقاح موفقیت آمیز است و به نظر می‌رسد نقش مؤثرتری در مقایسه با سایر فاکتورها مانند تعداد و مورفولوژی اسپرم ایفا می‌کند(۴۹). کاهش محسوس میزان تحرک اسپرم‌ها می‌تواند ناشی از اثرات سمی استرس اکسیداتیو ناشی از داروی سیکلوفسفامید بر روی تاژک اسپرم به واسطه کاهش سریع ATP داخل سلولی باشد(۵۰). با توجه به این‌که ATP منبع انرژی مهمی جهت تحرک اسپرم‌ها محسوب می‌گردد، کاهش در متابولیسم انرژی می‌تواند مسئول کاهش میزان تحرک اسپرم در موش‌های درمان شده با داروی سیکلوفسفامید باشد. اثر توکسیک مستقیم داروی سیکلو فسفامید بر روی اسپرماتوژنز در لوله‌های منی‌ساز به عنوان یکی از مکانیسم‌های عمل این دارو در تولید اسپرم‌های مرده و آسیب دیده در نظر گرفته می‌شود(۶). بر این اساس، با توجه به این که میزان تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) با میزان تولید اسپرم‌های مرده و غیر طبیعی ارتباط مستقیم دارد(۵۱)، به نظر می‌رسد که تخریب سلول‌های اسپرماتوژنیک و اختلال در روند اسپرمیوژنز در نتیجه استرس اکسیداتیو ناشی از داروی سیکلوفسفامید موجب افزایش میزان اسپرم های مرده و آسیب دیده در موش‌های درمان شده با این دارو می‌گردد که این اسپرم‌ها خود نیز از منابع اصلی تولید ROS در مایع منی محسوب می‌گردند(۵۳،۵۲). اما یکی از بهترین استراتژی‌های به کار گرفته شده توسط ترکیبات ضد توموری، القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی است(۵۴). بررسی‌های صورت گرفته نشان داده‌اند که مواجهه میتوکندری‌ها با ROS موجب آزاد سازی فاکتور القاء کننده آپوپتوز (AIF) می‌گردد که مستقیماً با DNA وارد واکنش شده، موجبات قطعه قطعه شدن آن را فراهم می‌آورد(۵۵). از سوی دیگر، استرس اکسیداتیو ناشی از داروی سیکلوفسفامید خود نیز می‌تواند موجب تخریب DNA سلول‌های زایا گردد که این امر افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های زایا و در نتیجه کاهش تعداد اسپرم را در پی خواهد داشت(۵۶) .نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اثر عصاره هیدروالکلی بومادران کاملاً به صورت وابسته به دوز است به نحوی که در دوز ۷۵

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

میلی‌گرم بر کیلوگرم توانست اثرات سمی سیکلوفسفامید بر وزن بدن و بیضه و هم‌چنین پارامترهای اسپرمی را جبران نموده و میزان آپوپتوز القا شده توسط دارو را تا حد زیادی کاهش دهد. بومادران احتمالاً با دارا بودن ترکیباتی از جمله فلاونوئیدها قادر به مهار آنزیم‌های دخیل در تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه مهار آپوپتوز القا شده توسط دارو است(۵۷). براساس مطالعه تکیه و همکاران (۲۰۱۱) نیز عصاره متانولی گیاه بومادران در دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیش‌ترین اثرات ضد التهابی تزریق ادجوانت کامل فروند (CFA) را داشته است(۵۸) که این یافته هم راستا با تحقیقات رشیدی و همکاران (۲۰۰۵) در مورد تأثیر بیش‌تر دوز ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی گیاه بومادران بر درمان التهاب زخم معده بود(۵۹). براساس یافته های این تحقیق دوز متوسط عصاره تأثیر چندانی در بهبود پارامترهای باروری نداشت اما دوز بالای عصاره اثر توکسیک داشته و مصرف همزمان آن با سیکلوفسفامید اثرات توکسیک دارو را تشدید نمود. مکانیسم دقیق اثرات کاهنده میزان باروری گل بومادران در موش نر معلوم نیست ولی ممکن است این اثرات مربوط به حضور ماده‌ای به نام فلاون در این گیاه باشد که توانایی اتصال به گیرنده هورمون‌های جنسی را داشته و با افزایش حساسیت سیستم آدنیلات سیکلاز تولید هورمون‌های جنسی را متوقف می‌کند(۶۰). هم‌چنین این گیاه سرشار از ماده‌ای به نام آپیژنین (Apigenin) می‌باشد که محرک تولید آنزیم‌های مرگ سلولی است(۶۱). در سایر مطالعات نیز استفاده از دوزهای بالاتر عصاره بومادران سبب ایجاد واکنش‌های حساسیتی عنوان شده است(۵۹). پرندین و همکاران (۲۰۱۱) گزارش نمودند که عصاره گل بومادران در دوز بالا (۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) شانس باروری را در موش‌های صحرایی نر کاهش می‌دهد(۶۲). کریشچی و همکاران (۲۰۰۶) نیز گزارش نمودند که عصاره گیاه بومادران به میزان ۱/۲g/kg/bw می‌تواند به عنوان یک ترکیب ضد باروری با اثرات برگشت‌پذیر در جنس نر معرفی شود. یعنی به مرور زمان اثرات عصاره از بین رفته و سلول‌های آسیب دیده ترمیم می‌شوند(۶۳). با جمع‌بندی یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که داروی سیکلوفسفامید از طریق بر هم زدن تعادل اکسیداسیون-احیاء سبب اختلال در روند اسپرماتوژنز و در نهایت مسمومیت تولید مثلی نر می‌گردد. حال آن که تجویز عصاره هیدروالکلی گل بومادران به میزان ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم تغییرات سوء شیمی درمانی را بر پارامترهای مختلف باروری کاهش داد و نقش حفاظتی خوبی بر آن‌ها داشت، البته پیشنهاد می‌شود مطالعات تکمیلی در سطوح سلولی و مولکولی جهت تعیین دوز مؤثر صورت گیرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه به خاطر تأمین بودجه این تحقیق و از آقای علی کریمی کارشناس بخش بافت شناسی و جنین شناسی به خاطر کمک های تکنیکی تشکر به عمل می‌آید.

References

1. Howell S, Shalet S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. Endocrinol Metab Clin North Am 1998; 27(4): 927-943.
2. Lewis RW, Dowling KJ, Schally AV. DTryptophan-6 analog of luteinizing hormone-releasing hormone as a protective agent against testicular damage caused by cyclophosphamide in baboons. Proc Nati Acad Sci USA 1985; 82(9): 2975-2979.
3. Howell SJ, Shalet SM. Testicular function following chemotherapy. Human Reprod Update 2001; 7(4): 363-369.
4. Brock N, Oxazaphosphorine cytostatics: past-presentfuture. Seventh Cain Memorial

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

Award lecture. Cancer Res 1989; 49 (1): 1-7.

5. Dollery CT. Cyclophosphamide. In: Dollery CT, editors. Therapeutic drugs. Edinburgh: Churchill Livingstone 1999: 349-353.
6. Anderson D, Bishop JB, Garner RC, Ostrosky-Wegman P, Selby PB. Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. Mutat Res 1995; 330(1-2): 115-181.
7. Fraiser LH, Kanekal S, Kehrer JP. Cyclophosphamide toxicity. Characterising and avoiding the problem. Drugs 1991; 42(5): 781-795.
8. Hengstler JG, Fuchs J, Tanner B, Oesch Bartlomo- wicz B, Hölz C, Oesch F. Analysis of DNA single-strand breaks in human venous blood: a technique which does not require isolation of white blood cells. Environ Mol Mutagen 1997; 29(1): 58-62.
9. Qiu J, Hales BF, Robaire B. Damage to rat spermatozoal DNA after chronic cyclophosphamide exposure. Biol Reprod 1995; 53(6): 1465-1473.
10. Cai L, Hales BF, Robair B. Induction a apoptosis in germ cells of adult male rats after exposure cyclophosphamide. Biol Reprod 1997; 56(6): 1490-1497.
11. Arumugam N, Sivakumar V, Thanislass J, Devara j H. Effects of acrolein on rat liver antioxidant de- fensesystem. Indian J Exp Biol 1997; 35(12): 1373-1374.
12. Mythili Y, Sudharsan PT, Selvakumar E, Varalak- shmi P. Protective effect of DL-alpha lipoic acid on cyclophosphamide induced oxidative cardiac injury. Chem Biol Interact 2004; 151(1): 13-19.
13. Abdoon AS, Kandil OM, Otoi T, Suzuki T. Influence of oocyte quality, culture media and gonadotropins on cleavage rate and development of in vitro fertilized buffalo embryos. Anim Reprod Sci 2001; 65(3-4): 215-223.
14. Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants from chemical to biochemical mechanisms. Food Chem Toxicol 1999; 37(9-10): 949-962.
15. Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. Bioassay 2000; 22(5): 423-430.
16. Hoseini A, Zare S, Ghaderi Pakdel F, Ahmadi A. Beneficial Effects of American Ginseng on Epididymal Sperm Analyses in Cyclophosphamide Treated Rats. Cell J 2012; 14(2): 116-121.
17. Bader A, Flamini G, Cioni PL, Morelli L. Essential oil composition of Achillea santolinaL. And Achillea biebersteinii Afan. Collectedin Jordan. Flavour Frag J 2003; 18(1): 363-368.
18. Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Mo'aser Publications. Iran, 1996: 11.
19. Vender RB. Adverse reactions to herbal therapy in dermatology. Skin Therapy Lett 2003; 8(3): 5-8.
20. Csupor-Löffler B, Hajdú Z, Zupkó I, Réthy B, Falkay G, Forgo P, et al. Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from Achillea millefolium s.l. on cultured human tumour cell lines. Phytother Res 2009; 23(5):672-676.
21. Al-Hindawi MK, Al-Deen IH, Nabi MH, Ismail MA. Anti-inflammatory activity of some Iraqi plants using intact rats. J Ethnopharmacol 1989; 26(2): 163-168.
22. Ardestani A, Yazdanparast R. Antioxidant and free radical scavenging potential of Achillea santolina extracts. Food Chem 2007; 104(1): 21-29.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

23. Kastner U, Sosa S, Tubaro A, Breuer J, Rucker G, Loggia R. Anti-edematous activity of sesquiterpene lactone from different taxa of the Achillea millefolium group. Planta Med Group 1993; 59: 669-675.
24. Petlevski R, Hadzija M, Slijepcevic M. Effect of antidiabet isherbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. J Ethnopharmacol 2001; 75(2-3): 181-184.
25. Akbarizadeh Z, Najafi Gh, Farokhi F. Effect of aquatic extract of Achillea millefolium on sperm and in vitro fertilization in adult rats treated with cyclosporine A. Journal of Zabol University of Medical Sciences and Health Services 2013; 4(4): 9-18.
26. Jalali Nadoushan MR, Ghosian Moghaddam MH, Chegini V, Jafari H, Zaeri F. Evalution of Antispermatogenic of Yarrow in mice. Tabibe Shargh 2008; 10(3): 219-225.
27. Montanari T, De Carvalho JE, Dolder H. Antispermatogenic effect of Achillea millefolium L. in mice. Contraception 1998; 58(5): 309-313.
28. Porter NG, Lammerink JP. Effect of temperature on the relative densities of essential oils and water. J Essent Oil Res 1994; 6(3): 269-277.
29. Cavalcanti AM, Baggio CH, Freitas CS, Rieck L, de Sousa RS, Da Silva-Santos JE, et al. Safety and antiulcer efficacy studies of Achillea millefolium L. after chronic treatment in Wistar rats. J Ethnopharmacol 2006; 107(2): 277–284.
30. Ordoñez A AL, Gomez J D, Vattuone M A, lsla M I. Antioxidant activities of sechium edule (Jacq) Swartz extracts. Food Chem 2006; 97(3): 452-458.
31. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estmation of total flavonoid content in proplis by two complementary colorimetric methods. Food Drug Anal 2002; 10: 178-182.
32. Takzaree N, Mortazavi H, Hassanzadeh Gh, Safaye S, Hossini MJ. Male rat spermatogenesis influenced by Achillea millefolium L. Tehran University Medical Journal 2013; 70(11): 684-690.
33. Das UB, Mallick M, Debnath JM, Ghosh D. Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide- induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. Asian J Androl 2002; 4(3): 201-207.
34. Najafi Gh, Hobenaghi R, Hoshyari A, Moghadaszadeh M, Ghorbanzadeh B. The effect of atrazine on spermic parameters and fertility potential in mature rats. Arak Medical University Journal 2013; 15(10) (69): 85-94.
35. Mohamadghasemi F, Faghani M, Fallah karkan M. The Protective Effect of Melatonin on Sperm Parameters, Epididymis and Seminal Vesicle Morphology in Adult Mouse Treated with Busulfan. Journal of Iranian Anatomical Sciences 2010; 10(30): 25-36.
36. Ebadi Manas Gh, Hasanzadeh Sh, Najafi Gh, Parivar K, Yaghmaei P. The effects of pyridaben pesticide on the DNA integrity of sperms and early in vitro embryonic development in mice. Iran J Reprod Med 2013; 11(8): 605-610.
37. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M. Relation between Different Human Sperm Nuclear Maturity Tests and In Vitro Fertilization. J Assist Reprod Genet 2001; 18(4): 219-225.
38. Codrington AM, Hales BF, Robaire B. Spermiogenic germ cell phase–specific DNA damage Following cyclophosphamide exposure. J Androl 2004; 25(3): 354-362.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

39. Giansanti V, Ivana Scovassi A. Cell death: A one-way journey to the graveyard. Open Biol J 2008; 1: 27-34.
40. Gardai SJ, Bratton DL, Ogden CA, Henson PM. Recognition ligands on apoptotic cells: aperspective. J Leukoc Biol 2006; 79(5): 896-903.
41. Schwartz LM, Ashwel JD. Model *Cell* Lines For The Study Of *Apoptosis* In Vitro." *Methods Cell* Biol. 1st ed. USA: Academic pess; 2001. p.20-187.
42. Mahfouz RZ, Shahram RK, Said TM, Erenpreiss J, Agarwal A. Association of sperm apoptosis and DNA ploidy with sperm chromatin quality in human spermatozoa. Fertil Steril 2009; 91(4): 1110-1118.
43. Jalali AS, Hasanzadeh Sh, Malekinejad H. Crataegus monogyna Aqueous Extract Ameliorates Cyclophosphamide-Induced Toxicity in Rat Testis: Stereological Evidences. Acta Med Iran 2012; 50(1): 1-8.
44. Deleve LD. Cellular target of cyclophosphamide toxicity in the murine liver: Role of glutathione and site of metabolic activation. Hepatology 1996; 24(4): 830-837.
45. Katoh C, Kitajima S, Saga Y, Kanno J, Horii I, Inoue T. Assessment of quantitative dual-parameter flow cytometric analysis for the evaluation of testicular toxicity using cyclophosphamide and ethinylestradiol treated rats. J Toxicol Sci 2002; 27(2): 87-96.
46. Elangovan N, Chiou TJ, Tzeng WF, Chu ST. Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. Toxicology 2006; 222(1-2): 60-70.
47. Selvakumar E, Prahalathan C, Sudharsan PT, Varalakshmi P. Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. Toxicology 2006; 217(1): 71-78.
48. Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. J Androl 2004; 25(1): 5-18.
49. Zhang H, Zhou QM, Li XD, Xie Y, Duan X, Min FL, et all. Increases fertile and asthenozoospermic infertile human sperm motility by induction of nitric oxide synthase. Arch Pharm Res 2006; 29(2): 145-151.
50. Rezvanfar MA, Sadrkhanlou R, Ahmadi A, Shojaei-Sadee H, Mohammadirad A, Salehnia A, Abdollahi M. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. Hum Exp Toxicol 2008; 27(12): 901-910.
51. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. Fertil Steril 1992; 57(2): 409-416.
52. Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. Am J Reprod Immunol 2008; 59(1): 2-11.
53. Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. Asian J Androl 2004; 6(1): 59-65.
54. Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. Int Rev Exp Pathol 1991; 32: 223-254.
55. Cande C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? J Cell Sci 2002; 115(pt 24): 4727-4734.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

56. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Hum Reprod Update 2003; 9(4): 331–345.
57. Roghani M, Baluchnejadmojarad T. Antinociceptive effect of Allium schoenoprasum L. oral feeding in male diabetic rats. J Shahrekord Univ Med Sci 2009; 12(4): 64-70.
58. Tekieh E, Akbari A, Manaheji H, Rezazadeh S, Zaringhalam J. Anti-hyperalgesicandanti-inflammatory effects of Achillea santolina and Stachys athorecalyx extracts on complete Freund's adjuvant–induced short-term inflammation in male wistar rats. Koomesh 2011; 12(3): 305-313.
59. Rashidi I, Taheri Moghadam M, Mozaffari AR. Study of inflammatory and healing effects of Achillea millefolium in the treatment of in dometacine-induced gastriculcer in rat. J Qazvin Univ Med Sci 2005; 8(4): 9-13.
60. Dhandapani S, Subramanina VR, Rajagopals S, Namasivayam N. Hypolipidemic effect of cuminum cyminum L. on all oxan-induced diabetic rats. Pharmacol Res 2002; 46(3): 251-255.
61. Jeong HJ, Shin YG, Kim IH, Pezzuto JM. Inhibition of aromatase activity by flavonoids. Arch Pharm Res 1999; 22(3): 309-312.
62. Parandin R, Ghorbani R, Sadeghipour Roodsari HR. Effects of Alcoholic Extract of Achillea Millefolium Flowers on Fertility Parameters in Male Rats. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences 2011; 19(1): 84-93.
63. Kryshchy P, Parivar K, Haeri Rohani A, Roustaiyan AH. The effect of Achillea millefolium L. extract on spermatogenesis and hormone-pituitary-gonadal axis in Balb/C mice. Lorestan Med Univ J (Yafteh) 2006; 6(3)(22): 13-18.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]