

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

Neda Asleirani¹,
Shapour Hasanzadeh²,
Mohammad Reza Sam³,
Gholam Reza Najafi Tazehkand⁴

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. Group 1 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).

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 ایرانیان^۱شاپور حسن زاده^۲محمد رضا سام^۳غلامرضا نجفی تازه کند^۴

چکیده

سابقه و هدف: سیکلوفسفامید (یک داروی شیمی درمانی با اثرات سوء فراوان بر ارگان های جنسی) به عنوان یک عامل نئوپلاستیک به طور گسترده در درمان سرطان های مختلف استفاده می شود. از طرفی، سیکلوفسفامید عامل اثرات سوء فراوان از جمله سمیت تولید مثلی شناخته شده است. بومادران گیاه دارویی با خواص آنتی اکسیدانتی 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 روش ها: 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.

یافته ها: سیکلوفسفامید سبب کاهش وزن بدن و بیضه شده، تأثیر منفی بر روی پارامترهای اسپرمی اعمال نموده و هم چنین 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 معنی داری 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 شیمی درمانی به طور گسترده در درمان بیماران مبتلا به سرطان استفاده می شود. از آنجایی که این داروها بر روی تقسیم سلولی سلول هایی که سرعت تقسیم بالایی دارند مانند

E-mail: s.hasanzadeh@urmia.ac.ir

مؤلف مسئول: شاپور حسن زاده - ارومیه: دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه

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

سلول‌های جنسی اثر بیش‌تری می‌گذارند (۱) مصرف این داروها می‌تواند توأم با اختلالات باروری باشد (۲). در این میان، عوامل شیمی درمانی با خاصیت آلکیل‌کنندگی 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 P450 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). فسفورآمیدموستارد 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 (۱۳،۱۴). آپوپتوز، نوعی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، می‌تواند در تمام مراحل زندگی و در همه سلول‌های بدن و از جمله سلول‌های زیای 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 (۱۷،۱۸). 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، سسکوییترین (Sesquiterpene)، لاکتون، بتاین، 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 سسکوییترین‌های موجود در این گیاه نسبت داده شده است (۲۳،۲۴). 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 (۲۶،۲۷). لذا در این تحقیق

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 روش‌ها

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 خلا (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 داشت (LD50)، ۳ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن محاسبه گردید.

۲. ارزیابی میزان ترکیبات فنلی عصاره

جهت اندازه‌گیری محتوای تام فنلی عصاره از معرف فولین سیو کالتیو استفاده گردید. بدین ترتیب که ۲/۵ میلی‌لیتر واکشنر 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 از گذشت 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 "میلی گرم 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 میلی‌لیتر 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 "میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره" گزارش گردید (۳۱).

۴. حیوانات مورد آزمایش

در این تحقیق ۶۴ قطعه موش سفید کوچک آزمایشگاهی نر نژاد (National Medical Research Institute) NMRI با میانگین سنی ۷-۸ هفته مورد مطالعه قرار گرفتند. حیوانات در شرایط مناسب با دمای ۲۵-۲۰°C، 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

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 آنوزین نگرزین استفاده شد. بدین منظور یک قطره از محیط کشت حاوی اسپرم روی یک لام قرار داده شد و به آن رنگ آنوزین-نگرزین اضافه گردید. اگر اسپرم زمان رنگ آمیزی 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 رنگ آمیزی آکریدین اورانج استفاده شد. این رنگ آمیزی برای تفريق DNA سالم و دورشته ای از DNA دناتوره شده تک رشته‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. اسپرم‌ها با DNA سالم بعد از رنگ آمیزی 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 اورانج تازه تهیه شده در بافر سترات فسفات (۰/۱۹ گرم پودر آکریدین اورانج در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر سترات فسفات) به مدت ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی 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

به صورت گاوژ 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 گاوژ دریافت نمودند (۳۲). گروه پنجم ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم سیکلوفسفامید (۳۳) به صورت گاوژ دریافت نمودند. گروه شش، هفت و هشت، همراه با ۵ گرم بر کیلوگرم سیکلوفسفامید به صورت گاوژ، به ترتیب ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره بومادران را به صورت گاوژ 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.

۱۱. آماده سازی اسپرم

به منظور خارج شدن اسپرم‌ها، دم اپیدیدیم‌ها به قطعات کوچک بریده شده و به داخل لوله فالكون‌های استریل حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت (Human Tubular Fluid) HTF منتقل شدند. سپس لوله فالكون‌ها در انکوباتور CO₂ 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).

۱۲. ارزیابی حرکت اسپرم

برای ارزیابی حرکت اسپرم، ۱ قطره از اسپرم‌های موجود در محیط کشت را روی یک اسلاید میکروسکوپی چکانده، سپس روی هر کدام یک لامل قرار داده، در هر حیوان حداقل ۵ میدان دید میکروسکوپی با بزرگنمایی

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

عکس رقت $\times 50000$ = تعداد اسپرم در ۵ خانه = تعداد اسپرم در هر میلی لیتر از محیط کشت

۱.۱. 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, San Diego, USA) استفاده گردید. پروتئین آنکسین V در حضور کلسم 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. بدین منظور نمونه محتوی 1×10^6 اسپرماتوزوئید به مدت ۶ دقیقه در ۵۰۰ rpm 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 محلول 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 آپوپتوتیک 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 $\pm$ انحراف معیار بیان شده و مقادیر $p < 0.05$ و کم‌تر از آن معنی‌دار تلقی شدند.

یافته‌ها

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 میلی گرم 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	147.25 ± 2.5	43.67 ± 1.5

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 ($p < 0.05$). در گروه پنجم، کاهش قابل توجه وزن بیضه در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت ($p < 0.01$) به نحوی که این کاهش حتی نسبت به گروه چهارم نیز معنی‌دار بود ($p < 0.05$). در این گروه وزن بدن نیز به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود ($p < 0.05$). 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

نداشت و اختلاف معنی دار با گروه کنترل داشت ($p < 0/01$). 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 معنی دار بودند ($p < 0/01$) (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 (بر حسب میلی گرم) در گروه های مورد مطالعه

گروه ها	وزن بدن (gr)	وزن بیضه (mg)
کنترل	$34/67 \pm 0/73$	$115 \pm 0/58$
بومادران (Low dose)	$35/5 \pm 0/3$	116 ± 1
بومادران (Medium dose)	$34/83 \pm 1/1$	115 ± 1
بومادران (High dose)	$33/83 \pm 0/33^*$	$110/33 \pm 0/33^*$
سیکلوفسفامید	$31/5 \pm 0/3^*$	$105/33 \pm 1^{***}$
سیکلوفسفامید+بومادران (Low dose)	$34 \pm 0/3$	$112 \pm 0/58$
سیکلوفسفامید+بومادران (Medium dose)	$33 \pm 0/8$	$108/33 \pm 1^{**}$
سیکلوفسفامید+بومادران (High dose)	$30/83 \pm 0/33^{**}$	$103 \pm 1/15^{***}$

* $p < 0/05$, ** $p < 0/01$, *** $p < 0/001$ (آزمون آنوای یکطرفه و تست توکی).

۳. ارزیابی تعداد اسپرم ها

مصرف عصاره بومادران به تنهایی و در دوزهای کم و متوسط اگر چه تعداد اسپرم ها را افزایش داد ولی این افزایش نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود. در گروه پنجم تعداد اسپرم ها در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافت ($p < 0/01$). تعداد اسپرم ها در اثر مصرف همزمان سیکلوفسفامید با دوز کم عصاره تا حد زیادی افزایش یافت به نحوی که اختلاف معنی داری با گروه پنجم داشت ($p < 0/01$) اما نتوانست تا حد گروه کنترل جبران شود و اختلاف معنی داری با گروه کنترل داشت ($p < 0/05$). مصرف همزمان سیکلوفسفامید با دوز متوسط عصاره نتوانست تعداد اسپرم ها را تا حد معنی داری افزایش دهد و در گروه هشتم، برعکس تعداد اسپرم ها نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($p < 0/01$) که البته نسبت به گروه پنجم معنی دار نبود (جدول شماره ۳).

۴. ارزیابی تحرک اسپرم ها

در این مطالعه، تحرک اسپرم ها در گروه های دوم و

سوم تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشت. مصرف دوز زیاد عصاره سبب کاهش معنی دار در تحرک اسپرم ها نسبت به گروه کنترل شد ($p < 0/01$). در گروه پنجم نیز تحرک اسپرم ها نسبت به گروه کنترل به صورت معنی دار کاهش یافت ($p < 0/01$) که بامصرف توأم سیکلوفسفامید و دوز کم عصاره تا حد قابل توجهی جبران شده بود و اختلاف معنی داری با گروه پنجم نشان داد ($p < 0/01$). مصرف سیکلوفسفامید به همراه دوز متوسط عصاره تأثیر معنی داری بر روی تحرک اسپرم ها نداشت و مصرف سیکلوفسفامید با دوز زیاد عصاره سبب کاهش درصد اسپرم های متحرک شد که البته در مقایسه با گروه پنجم معنی دار نبود (جدول شماره ۳).

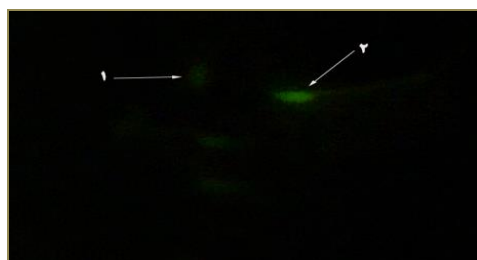
۵. ارزیابی قابلیت زنده ماندن اسپرم ها

در گروه های دوم و سوم، افزایش تعداد اسپرم های زنده نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود، اما مصرف دوز زیاد عصاره سبب کاهش معنی دار اسپرم های زنده نسبت به گروه کنترل شد ($p < 0/01$). در گروه پنجم نیز کاهش معنی دار در درصد اسپرم های زنده نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0/01$). این کاهش در اثر مصرف همزمان سیکلوفسفامید با دوز کم عصاره جبران شده بود و اختلاف معنی داری با گروه پنجم داشت ($p < 0/01$). مصرف دوز متوسط عصاره به همراه سیکلوفسفامید تأثیر معنی داری بر روی درصد زنده ماندن اسپرم ها نداشت و مصرف دوز زیاد عصاره همراه با سیکلوفسفامید سبب افزایش تعداد اسپرم های مرده شده بود که البته این اختلاف نسبت به گروه پنجم معنی دار نبود (جدول شماره ۳) (تصویر شماره ۱-الف).

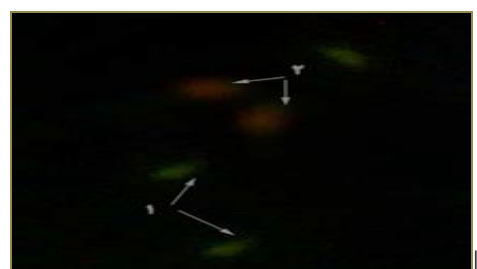
۶. ارزیابی کیفیت DNA اسپرم ها

رنگ آمیزی آکریدین اورنج در این مطالعه نشان داد که تعداد اسپرم ها با DNA آسیب دیده در گروه های دوم و سوم تفاوت معنی داری با گروه کنترل ندارد. در گروه چهارم تعداد این اسپرم ها نسبت به گروه کنترل

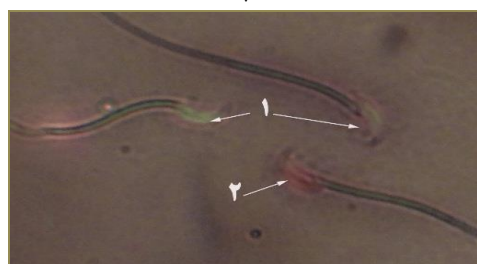
معنی داری با گروه پنجم نداشت (جدول شماره ۳) (تصویر شماره ۱-ج).



(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 DNA آسیب 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 $\times 1000$).

افزایش داشت ($p < 0.05$). در گروه پنجم نیز تعداد اسپرم ها با DNA آسیب دیده نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($p < 0.001$). در گروه ششم با دریافت همزمان سیکلوفسفامید و دوز کم عصاره کاهش معنی داری در درصد اسپرم ها با DNA آسیب دیده نسبت به گروه پنجم وجود داشت ($p < 0.001$). برعکس تعداد اسپرم ها با DNA آسیب دیده در گروه هفتم نسبت به گروه پنجم افزایش نیز یافته بود که البته معنی دار نبود. در گروه هشتم با مصرف سیکلوفسفامید به همراه دوز زیاد عصاره تعداد این اسپرم ها به طور قابل توجهی افزایش یافته و اختلاف معنی دار با گروه پنجم داشت ($p < 0.05$) (جدول شماره ۳) (تصویر شماره ۱-ب).

۷. ارزیابی میزان آپوپتوز اسپرم ها

در این بررسی میزان وقوع آپوپتوز در گروه های دوم، سوم و چهارم تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشت. در گروه پنجم تعداد اسپرم های آنکسین V مثبت در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافته بود ($p < 0.05$) و با مصرف همزمان سیکلوفسفامید با دوز کم عصاره میزان آپوپتوز القا شده در اسپرم ها تا حد گروه کنترل جبران شده بود به نحوی که تعداد اسپرم های آنکسین V مثبت کاهش معنی داری نسبت به گروه پنجم داشت ($p < 0.05$). در اثر مصرف توأم سیکلوفسفامید و دوز متوسط عصاره القا آپوپتوز در اسپرم ها تشدید شده بود. این افزایش در گروه هشتم مشهودتر بود که البته در هیچ یک از آن ها اختلاف

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 ($\times 10^6/ml$)	تحرک اسپرم (%)	زیست پذیری (%)	آکریدین اورنج (%)	درصد اسپرم های Annexin-V+
کنترل	31/5±1/15	77/67±2/33	79±2/1	18/84±2/36	20/71±1/61
بومادران (Low dose)	34/1±0/3	82/33±0/88	83±1/15	11/15±0/6	12/17±1/06
بومادران (Medium dose)	32/17±0/55	78/67±2/18	80±2/1	15/88±2/1	20/61±1/24
بومادران (High dose)	19/67±0/68***	34/33±1/76***	35±2/1***	31/94±3/7*	26/23±2/53
سیکلوفسفامید	15±1/12***	29±1/73***	30±2/1***	37/5±2/41***	33/61±2/17*
سیکلوفسفامید+بومادران (Low dose)	26/67±1/01*	52±3***	54±2/52***	22/41±1/45	21/5±0/89
سیکلوفسفامید+بومادران (Medium dose)	17±1/13***	31/33±3/56***	32±2/61***	41/77±2/5***	30/36±3/72
سیکلوفسفامید+بومادران (High dose)	9/17±1/34***	15/33±1/45***	16±2/1***	48/72±1/3***	40/17±3/46***

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (آزمون آنوای یکطرفه و تست توکی).

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 بی تردید مهم ترین 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 معنی دار وزن بدن و بیضه موش ها می گردد. دلو و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه خود کاهش وزن ناشی از مصرف سیکلوفسفامید را سمیت ناشی از این دارو در کبد، کلیه و سایر ارگان ها گزارش نمودند (۴۴). از آن جاکه وزن بیضه به میزان زیادی به توده های سلولی تمایز یافته موجود در آن وابسته است، کاهش محسوس در وزن بیضه ناشی از داروی سیکلوفسفامید با دژنراسیون و کاهش تعداد سلول های زیبا و میزان پایین اسپرماتوژنز در ارتباط می باشد (۴۵). بررسی های به عمل آمده در این مطالعه هم چنین آشکار ساخت که تجویز داروی سیکلوفسفامید کاهش معنی داری را در تعداد و میزان تحرک اسپرم ها و در عین حال افزایش معنی داری را در میزان اسپرم های مرده در پی دارد که این یافته ها نیز گزارشات قبلی در این زمینه را تأیید می کند (۴۷،۴۶). کاهش تعداد اسپرم ها متعاقب تجویز داروی سیکلوفسفامید به شکل واضحی مؤید کاهش سلول های اسپرماتوژنیک بوده و هجوم رادیکال های آزاد حاصل از متابولیسم داروی سیکلوفسفامید را خاطر نشان می سازد. در واقع آسیب اکسیداتیو اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دو گانه (PUFAs) غشاء های سلولی موجب اختلال در سیالیت و نفوذ پذیری غشاء های سلولی می گردد که این امر می تواند موجب آسیب دیدگی سلول هایی نظیر سلول های زایای بیضه و اسپرم ها گردد (۴۸). براساس مطالعات پیشین، قدرت تحرک اسپرم ها به عنوان عامل تعیین کننده و مؤثر در باروری بوده و متضمن لقاح موفقیت آمیز است و به نظر می رسد نقش مؤثرتری در مقایسه با سایر فاکتورها مانند

تعداد و مورفولوژی اسپرم ایفا می کند (۴۹). کاهش محسوس میزان تحرک اسپرم ها می تواند 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 این که ATP منبع انرژی مهمی جهت تحرک اسپرم ها محسوب می گردد، کاهش در متابولیسم انرژی می تواند مسئول کاهش میزان تحرک اسپرم در موش های درمان شده با داروی سیکلوفسفامید باشد. اثر توکسیک مستقیم داروی سیکلوفسفامید بر روی اسپرماتوژنز در لوله های منی ساز به عنوان یکی از مکانیسم های عمل این دارو در تولید اسپرم های مرده و آسیب دیده در نظر گرفته می شود (۶). بر این اساس، با توجه به این که میزان تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) با میزان تولید اسپرم های مرده و غیر طبیعی ارتباط مستقیم دارد (۵۱)، به نظر می رسد که تخریب سلول های اسپرماتوژنیک و اختلال در روند اسپرمیوژنز در نتیجه استرس اکسیداتیو ناشی از داروی سیکلوفسفامید موجب افزایش میزان اسپرم های مرده و آسیب دیده در موش های درمان شده با این دارو می گردد که این اسپرم ها خود نیز از منابع اصلی تولید ROS در مایع منی محسوب می گردند (۵۲،۵۳). اما یکی از بهترین استراتژی های به کار گرفته شده توسط ترکیبات ضد توموری، القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی است (۵۴). بررسی های صورت گرفته نشان داده اند که مواجهه میتو کندری ها با ROS موجب آزاد سازی فاکتور القاء کننده آپوپتوز (AIF) می گردد که مستقیماً با DNA وارد واکنش شده، موجبات قطعه قطعه شدن آن را فراهم می آورد (۵۵). از سوی دیگر، استرس اکسیداتیو ناشی از داروی سیکلوفسفامید خود نیز می تواند موجب تخریب DNA سلول های زیبا گردد که این امر افزایش میزان آپوپتوز در سلول های زیبا 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

میلی گرم بر کیلوگرم توانست اثرات سمی سیکلوفسفامید بر وزن بدن و بیضه و هم چنین 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 میلی گرم 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 بیش تر دوز ۷۵ میلی گرم 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 می کند (۶۰). هم چنین این گیاه سرشار از ماده‌ای به نام آپیژنین (Apigenin) می باشد 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 میلی گرم بر کیلوگرم) شانس باروری را در موش‌های صحرایی نر کاهش می دهد (۶۲). کریشچی و همکاران (۲۰۰۶) نیز گزارش نمودند که عصاره گیاه بومادران به میزان ۱/۲g/kg/bw می تواند به عنوان یک ترکیب ضد باروری با اثرات برگشت پذیر در جنس نر معرفی شود. یعنی به مرور زمان اثرات عصاره از بین رفته و سلول‌های آسیب دیده ترمیم می شوند (۶۳). با جمع بندی یافته‌های مطالعه حاضر می توان چنین نتیجه گیری نمود که داروی سیکلوفسفامید از طریق بر هم زدن تعادل اکسیداسیون- احیاء سبب اختلال در روند اسپرماتوژنز و در نهایت مسمومیت تولید مثلی نر می گردد. حال آن که تجویز عصاره هیدروالکلی گل بومادران به میزان ۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم تغییرات سوء شیمی درمانی را بر پارامترهای مختلف باروری کاهش داد و نقش حفاظتی خوبی بر آن‌ها داشت، البته پیشنهاد می شود مطالعات تکمیلی در سطوح سلولی و مولکولی جهت تعیین دوز مؤثر صورت گیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله 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 می آید.

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. D-Tryptophan-6 analog of luteinizing hormone-releasing hormone as a protective agent against testicular damage caused by cyclophosphamide in baboons. *Proc Natl 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-present-future. *Seventh Cain Memorial*

- 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, Thanisslass 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 santolina* L. And *Achillea biebersteinii* Afan. Collected in 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.

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 Antispermatogetic of Yarrow in mice. *Tabibe Shargh* 2008; 10(3): 219-225.
27. Montanari T, De Carvalho JE, Dolder H. Antispermatogetic 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, Isla 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. Spermiogetic germ cell phase-specific DNA damage Following cyclophosphamide exposure. *J Androl* 2004; 25(3): 354-362.

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 press; 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.

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-hyperalgesic and anti-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 gastric ulcer 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.