مقاله پژوهشی

ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدانتی عصاره گیاه جینسینگ و ویتامین E بر باروری موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر به دنبال تیمار طولانی مدت با سیکلوفسفامید

اکرم حسینی[۱]، صمد زارع[۱]، فیروز قادری پاکدل[۲]*، عباس احمدی[۳]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ارومیه، ارومیه، ایران

۳- گروه جنین شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

زمینه و هدف: سیکلوفسفامید (CP) یک داروی ضد سرطان است که بعد از متابولیسم در کبد به عنوان یک عامل آلکیلاسیون عمل می‌کند. این دارو علیرغم کاربردهای کلینیکی فراوان در درمان سرطان، دارای اثرات سمی بر یاخته‌های بدن به ویژه در ارگان‌های جنسی می‌باشد. یکی از مهمترین عوارض جانبی آن، تغییر عملکرد سیستم تناسلی در جنس نر است که ممکن است منجر به ناباروری گردد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات آنتی اکسیدانتی عصاره گیاه جنسینگ و ویتامین E به تنهایی و همراه هم بر سمیت القاء شده توسط داروی سیکلوفسفامید در دستگاه تناسلی موش‌های بزرگ سفید آزمایشگاهی نر می‌باشد.

روش بررسی: موش‌های نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۲۲۰±۳۰g به طور تصادفی در هشت گروه هفت تایی تقسیم شدند. حیوانات گروه اول جهت حذف اثر استرس گاواژ به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد که فقط آب و غذا دریافت کردند. گروه دوم حلال دارو را به صورت گاواژ و گروه سوم ۶/۱mg/kg سیکلوفسفامید به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت نمودند. گروه چهارم ۵۰۰mg/kg عصاره جینسینگ و گروه پنجم ۱۰۰mg/kg ویتامین E به صورت گاواژ دریافت کردند. گروه ششم دوزهای مؤثر جینسینگ و سیکلوفسفامید و گروه هفتم، دوزهای مؤثر ویتامین E و سیکلوفسفامید را همزمان و به فاصله ۱ ساعت از هم دریافت کردند. گروه هشتم نیز هر دو آنتی اکسیدانت را همزمان با هم و یک ساعت قبل از تزریق سیکلوفسفامید دریافت کردند. تیمار به صورت روزانه و به مدت ۵۰ روز ادامه داشت. یک روز بعد از پایان دوره تیمار، حیوانات کشته شده و بعد از اندازه‌گیری وزن بدن و بیضه‌ها، نمونه‌برداری از بافت‌ها انجام و تعداد موش‌های ماده آبستن شده، تعداد زاده‌ها، میزان باروری در موش‌های نر و برخی از پارامترهای اسپرم بررسی شد. داده‌ها توسط نرم افزار آماری GB STAT و براساس آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه تحلیل شد. مقادیر $p<0/05$ و $p<0/01$ معنی‌دار تلقی شد.

نتایج: در گروه‌هایی که در معرض سیکلوفسفامید قرار داشتند تعداد اسپرم، تعداد اسپرم‌های زنده کاهش معنی‌دار و تعداد اسپرم‌های بد شکل و ناهنجار افزایش معنی‌دار نشان دادند ($p<0/01$). به علاوه میزان باروری در موش‌های نر، تعداد ماده‌های آبستن و تعداد نوزادان متولد شده در این گروه کاهش یافتند. در حالیکه مصرف آنتی اکسیدانتها اختلالات فوق را به‌طور معنی‌دار کاهش داد.

نتیجه‌گیری: شیمی درمانی کیفیت زندگی بیماران مبتلا به سرطان را بهبود می‌بخشد. اما علیرغم این موفقیتها، اکثر داروهای ضد سرطان باعث ایجاد آسیب‌های ناخواسته می‌شود. با توجه به عوارض جانبی کمتر این ترکیبات، به نظر می‌رسد که به کارگیری محصولات آنتی اکسیدانتی مانند عصاره برخی از گیاهان و یا ویتامینها عملکرد مناسبی در کاهش سمیت سیکلوفسفامید داشته باشند.

کلید واژگان: پارامترهای اسپرم، سیکلوفسفامید، شیمی درمانی، عصاره جینسینگ، موش بزرگ آزمایشگاهی، ناباروری مردان، ویتامین E.

نحوه استناد به این مقاله: حسینی اکرم، زارع صمد، قادری پاکدل فیروز، احمدی عباس. ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدانتی عصاره گیاه جینسینگ و ویتامین E بر باروری موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر به دنبال تیمار طولانی مدت با سیکلوفسفامید. فصلنامه باروری و ناباروری: سال ۱۱ (۱۳۸۹)، شماره ٤، صفحات: ۲۳۷-۲۲۷.

* **مسئول مکاتبه:** فیروز قادری پاکدل، معاونت تحقیقات و فنآوری، ستاد دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، انتهای خیابان جهاد، بلوار رسالت، ارومیه، ایران

رایا نامه:
info@ghaderipakdel.com
fgpakdell@umsu.ac.ir

دریافت: ۸۹/۲/٤

پذیرش: ۸۹/٤/۷

Archive of SID

www.SID.ir

زمینه و هدف

اختلال در تولید و عملکرد اسپرم و آسیب در روند اسپرماتوژنز از شایع‌ترین علل ناباروری مردان به شمار می‌رود. تروما یا نقص‌های آناتومیکی در سیستم تناسلی و یا استفاده از برخی داروها برای درمان بیماریها، باعث اختلال در تولید اسپرم و در نهایت منجر به عقیمی در مردان می‌شود. سیکلوفسفامید[1] یکی از عوامل شیمی درمانی است که در درمان سرطان‌های مختلف، لوسمی‌های حاد و مزمن، لنفوم‌های بدخیم مثل بیماری هوچکین، سرکوبگر سیستم ایمنی و بیماری‌های خودایمنی مثل آرتریت روماتوئید و ... به طور وسیعی به کار می‌رود (۱). علیرغم کاربردهای کلینیکی فراوان، این دارو اثرات مخربی مانند سمیت دستگاه تناسلی در انسانها و حیوانات آزمایشگاهی که در معرض این دارو قرار می‌گیرند، دارد (۲). مکانیسم عمل سیکلوفسفامید در ایجاد اختلالات بیضوی هنوز به طور کامل شناخته نشده است؛ اما مطالعات متعددی نشان می‌دهند که سیکلوفسفامید قادر به بر هم زدن واکنش‌های احیاگر در بافتها است. اختلالات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بوجود آمده، حاصل تولید مفرط استرس اکسیداتیو می‌باشد (۵-۳).

سیکلوفسفامید متعلق به گروه اکسازافسفورین و یک عامل آلکیله کننده است. این ترکیب دارای خواص سیتواستاتیکی، سیتوتوکسیسیتی و موتاژنی می‌باشد. خاصیت سمیت آن برای سلول با آلکیله کردن DNA در موقعیت N7 گوانین و شکل‌گیری پیوندهای عرضی بین DNA – DNA و DNA – پروتئین و رشته‌های تکی DNA می‌باشد، که در نهایت باعث تخریب عملکرد اسیدهای نوکلئیک شده و از سنتز DNA جلوگیری می‌کند (۶). سیکلوفسفامید در محیط خارج از بدن غیرفعال است و در داخل بدن، در کبد توسط آنزیم‌های سیتوکروم P-۴۵۰ به ۴- هیدروکسی سیکلوفسفامید تبدیل می‌شود که با توتومر خود یعنی آلدوفسفامید در تعادل می‌باشد. آلدوفسفامید به طور خودبخود تجزیه شده و به متابولیت‌های فعال خود یعنی فسفورآمیدموستارد[2] و آکرولین[3] تبدیل می‌شود (۷،۸).

اثرات آنتی نئوپلاستیکی سیکلوفسفامید مربوط به فسفورآمیدموستارد است؛ در حالیکه آکرولین از طریق تداخل با سیستم دفاعی آنتی اکسیدانتی بافتها (۹) تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن کرده (۱۰) و مسئول پیدایش اثرات سمی مانند مرگ سلولی، آپوپتوز، تشکیل تومورهای متعدد و نکروز می‌باشد (۱۱). ترکیبات بیولوژیک با خواص آنتی اکسیدانی قادرند که سلولها و بافتها را در برابر اختلالات حاصل از گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد حفاظت کنند (۱۲،۱۳). بنابراین تجویز آنتی اکسیدانها در طول شیمی درمانی به منظور کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز سیکلوفسفامید و سمزدایی بافتها ضروری به نظر می‌رسد.

جینسینگ[4] گیاه داروئی معطر و پایا متعلق به جنس panax و خانواده آرالیاسه[2] (عشقه) است (۱۴) و در طب سنتی کشورهای آسیایی رایج است (۱۵). خاصیت دارویی گیاه جینسینگ مربوط به ریشه آن است. با به کارگیری تکنیک‌های HPLC و LC/MS ترکیبات تشکیل دهنده ریشه جینسینگ شناسائی گشته و مشخص شده است که ریشه این گیاه حاوی ساپونین‌های تری‌ترپنی، روغن‌های ضروری، پلی‌استیلن، پلی‌ساکارید، پپتیدوگلیکان، ترکیبات نیتروژنی، اسیدهای چرب، کربوهیدراتها و ترکیبات فنولی می‌باشد (۱۶). مهمترین جزء فعال این گیاه جین سینوسایدها (ساپونینها) هستند که ساختار تری‌ترپنی دارند و فعالیت‌های فارماکولوژیکی گیاه جینسینگ مربوط به این ترکیبات می‌شود (۱۷).

گیاه جینسینگ به عنوان آداپتوژن محسوب می‌شود (۱۹،۱۸). آداپتوژن به معنی فرآورده گیاهی با خواص آنتی‌اکسیدانی است که افزاینده مقاومت بدن در برابر عوامل استرس‌زا، تروما، اضطراب، ضعف و خستگی می‌باشد. همچنین به عنوان یک محرک روحی و تونیک استفاده می‌شود (۲۰). عصاره این گیاه همچنین بر سیستم عصبی مرکزی اثر داشته (۲۲،۲۱) و در دستگاه گردش خون موجب

1- Cyclophosphamide
2- Phosphoramide mustard
3- Acrolein
4- Ginseng

Archive of SID
www.SID.ir

اتساع عروق می‌شود (۲۳). عصاره این گیاه از طریق محور هیپوتالاموس– هیپوفیز– آدرنال عمل می‌کند (۲۴،۲۵). از خواص دیگر این گیاه می‌توان به موارد ضد سرطانی، آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد اضطرابی و... اشاره کرد (۲۶،۲۷). مطالعاتی مروری و میدانی در خصوص اثرات درمانی و پیشگیری کنندگی گیاه جینسینگ در سرطانها صورت گرفته است (۲۷). در خصوص بسیاری از اثرات عصاره این گیاه و مکانیسم‌های دخیل و نیز مقادیر موثر هنوز مطالعات حیوانی کافی صورت نگرفته است.

ویتامین E یک آنتی اکسیدان قوی است (۲۸) که نقش حمایتی آن در کیفیت و کمیت اسپرم، لقاح و باروری در انسانها گزارش شده است (۲۹). این ویتامین به مقدار زیاد در سلول‌های سرتولی، اسپرماتوسیت (در مرحله پاکیتن) و به مقدار کمتر در اسپرماتیدهای گرد وجود دارد (۳۰). ویتامین E با خاصیت ضد آلکیله کنندگی خود، از آسیب اسیدهای چرب غیراشباع بافتها در برابر رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون ممانعت کرده و باعث پایداری غشاء سلولها می‌شود (۲۸،۳۱). اهمیت ویتامین E مربوط به توانایی آن در حمایت از ارگانیسمها در برابر حمله رادیکال‌های آزاد می‌باشد.

Sabik و همکاران اثرات حمایتی ویتامین E و گیاه زنجبیل برسمیت القاء شده توسط سیکلوفسفامید در دستگاه تولید مثل موش‌های نر، پیش از شروع دوره شیمی درمانی را گزارش کردند (۳۲).

اگرچه امروزه شاخه‌ایی از علوم دارویی در خصوص گیاهان دارویی توسعه یافته است؛ اما هنوز در بسیاری از موارد استفاده از گیاهان دارویی و یا ترکیبات فعال بیولوژیک و نیز کاهش دوزهای مصرفی آنها و افزایش اثر بخشی این ترکیبات از موضوعات مهم تحقیقی است. در بسیاری از موارد استفاده از داروهای گیاهی به دلیل مشخص نبودن مکانیسم اثر و نیز دوز موثر استفاده از آنها در فارماکوپه کشورها رایج نشده است. بسیاری از داروهای شیمی درمانی دارای اثرات سمی و عوارض جانبی فراوانی بر ارگان‌های مختلف بدن مانند بیضه می‌باشند. به نظر می‌رسد اگرچه بکار گیری هر کدام از ترکیبات آنتی اکسیدانتی به تنهایی می‌تواند موجب ترمیم یا حذف نسبی اثرات ترکیبات استرس اکسیداتیو گردد ولی امروزه استفاده از ترکیباتی که بتوانند اثر ادجوانتی یا سینرژیستی داشته باشند جزء تحقیقات قابل توجه دانشمندان است. در این حالت معمولاً یک ترکیب با دوز کم می‌تواند اثرات ترکیب دیگر را تشدید کرده و از سمیت آن بکاهد. بنابراین به کار گرفتن یک استراتژی و راه حل جهت کاهش عوارض جانبی داروهای شیمی درمانی با حفظ اثرات درمانی این ترکیبات ضروری می‌باشد. این تحقیق سعی داشته تا به بررسی اثرات سینرژیست گیاه جینسینگ و ویتامین E در کاهش عوارض سیکلوفسفامید روی دستگاه تولید مثلی موش‌های نر به پردازد.

روش بررسی

مواد و داروها: در این پژوهش سیکلوفسفامید، ائوزین y، نگروزین از شرکت Merck آلمان، ویتامین E به صورت محلول خوراکی از شرکت Sigma-Aldrich آمریکا، کپسول جینسینگ با مقادیر مشخص ترکیبات فعال از شرکت دارویی Xingong چین و نمکهای مورد استفاده از شرکت Merck آلمان تهیه شدند.

حیوانات آزمایشگاهی: ۵۶ سر موش نر بالغ بزرگ سفید آزمایشگاهی[1] از نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۲۰±۳۰gr در خانه حیوانات دانشکده علوم دانشگاه ارومیه در شرایط مناسب با درجه حرارت کنترل شده ۲۳±۲ ℃، دوره نوری ۱۲ ساعت روشنائی ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۴۰-۶۰٪ پرورش و نگهداری شدند. در طول دوره تیمار حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند و شرایط پرورش برای تمام حیوانات یکسان بود. بعد از رسیدن به بلوغ (حدود ۳ ماهگی) حیوانات به طور تصادفی در هشت گروه ۷ تایی گروه‌بندی شدند.

حیوانات گروه اول جهت حذف اثر استرس گاواژ[2] به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. این گروه به جز آب و غذا، ترکیب دیگری دریافت نکردند.

1- Rat
2- Gavage

Archive of SID
www.SID.ir

در گروه دوم حیوانات حلال دارو را به صورت گاواژ دریافت می‌کردند.

گروه سوم؛ ٦/١mg/kg سیکلوفسفامید به صورت تزریق داخل صفاقی (IP) دریافت نمودند.

گروه چهارم؛ ٥٠٠mg/kg عصاره جینسینگ به صورت گاواژ دریافت کردند.

گروه پنجم؛ ١٠٠mg/kg ویتامین E به صورت گاواژ دریافت کردند.

گروه ششم: دوزهای مؤثر جینسینگ و سیکلوفسفامید را همزمان و به فاصله ١ ساعت از هم دریافت کردند.

گروه هفتم: دوزهای مؤثر ویتامین E و سیکلوفسفامید را همزمان و به فاصله ١ ساعت از هم دریافت کردند.

گروه هشتم: هر دو آنتی اکسیدانت را همزمان با هم و یک ساعت قبل از تزریق سیکلوفسفامید دریافت کردند. تیمار به صورت روزانه و به مدت ٥٠ روز برای تمامی گروهها ادامه داشت.

در انتهای دوره درمانی، حیوانات با اتر بیهوشی عمیق گرفتند و با قطع سر کشته شدند. بعد از نمونه برداری و توزین بدن و بیضه‌ها، اپیدیدیم از بدن خارج و بخش دم آن در ٥ml محیط کشت Ham's F10 (٣٧ ℃) قرار داده شد و به وسیله قیچی قطعه قطعه گردید و به مدت ٥ دقیقه به آرامی در داخل انکوباتور CO_2، ٣٧ ℃ تکان داده شد تا اسپرم‌های موجود در آن آزاد شدند و در محیط به صورت شناور درآیند.

جهت بررسی قابلیت حیات[1] اسپرم، یک قطره از محلول سوسپانسیون فوق روی یک لام قرار داده شد و به آن رنگ ائوزین – نکروزین 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 بخود رنگ گرفته به رنگ صورتی مشاهده می‌شوند. با محاسبه تعداد اسپرم‌های رنگ نگرفته به کل تعداد اسپرم‌های موجود، درصد اسپرم‌های زنده به دست می‌آید.

برای بررسی شکل ظاهری اسپرمها[2]، یک قطره از سوسپانسیون فوق روی لام قرار داده شد و از رنگ آمیزی آنیلین بلو استفاده شد. برخی از انواع بدشکلی‌های اسپرم شامل موارد زیر می‌باشد: اسپرم‌های بدون دم، سر غیر طبیعی، ساختارهای غیر طبیعی دم، ساختارهای غیر طبیعی دم به همراه قطره سیتوپلاسمی پیشین، ساختارهای غیر طبیعی دم به همراه قطره سیتوپلاسمی می‌باشد.

برای شمارش اسپرم[3]، مطابق روش‌های استاندارد و رایج در مطالعات مشابه، دم اپیدیدیمها در داخل ٥ml محیط کشت Ham'sF 10، ٣٧ ℃ قرار داده شد و سپس با ایجاد دو برش عرضی و دو برش طولی، به مدت ٢٠ دقیقه درون انکوباتور CO2 قرار داده شد. سپس از انکوباتور خارج و قطعات اپیدیدیم از محلول بیرون آورده شد و با هم زدن محلول کاملاً هموژن گردید. سپس رقت ١/٢٠ از نمونه تهیه شد (برای رقیق کردن نمونه از محیط کشت Ham'sF10 استفاده گردید). یک تا دو قطره از نمونه را بر روی لام نئوبار منتقل گردید و روی آن با لامل پوشانده و شمارش اسپرم انجام شد (٣٤،٣٣). در بررسی عوامل فوق، مشاهده کلیه لامها با میکروسکوپ نوری و بزرگنمائی ٤٠ صورت گرفت.

بررسی میزان باروری موش‌های صحرایی نر: جهت بررسی اثر داروها بر میزان باروری موش‌های نر، بعد از گذشت ٤٠ روز از شروع تجویز داروها از هر گروه ٤ موش به طور تصادفی انتخاب کرده و در قفس‌های جداگانه، هر موش نر با ٢ موش ماده جوان و بالغ به مدت ١٠ روز هم جوار گردید.

همجواری موشها در ساعات بعدازظهر انجام شد و صبح روز بعد، واژن موش‌های ماده مشاهده گردید که در صورت وجود نوعی لخته سفید، اسمیر واژینال از آن تهیه و در زیر میکروسکوپ بررسی شد تا از وجود یا فقدان اسپرم در گسترش تهیه شده اطمینان حاصل شود.

روز مشاهده اسپرم در نمونه‌ها، روز صفر بارداری محسوب می‌شود. یک رت نر را وقتی می‌توان بارور در نظر گرفت که حداقل یکی از رت‌های ماده را باردار کرده باشد

1- Viability

2- Morphology
3- Count

Archive of SID
www.SID.ir

موش‌های ماده تا پایان دوره بارداری در قفس‌های جداگانه نگهداری شد. حدود ۲۱-۲۳ روز بعد، نوزادها متولد شده و زاده‌ها بررسی شدند.

شایان ذکر است که ضریب باروری به صورت تعداد ماده‌های آبستن یا تعداد نرهای مورد انتخاب شده در این تست ×۱۰۰ در نظر گرفته شد (۳۵).

آنالیز آماری: به منظور مقایسه آماری، یافته‌ها با استفاده از نرم افزار GB STAT و آزمون آنالیز واریانس یکطرفه مورد تحلیل قرار گرفتند یافته‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار بیان و مقادیر ($p<0/05$) و ($p<0/01$) از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی شدند. جهت ارزیابی تفاوت معنی‌دار بین گروهها از t-student test استفاده شد.

نتایج

اثر بر وزن حیوان: با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۱، مشاهده شد که پس از اتمام دوره تیمار، وزن بدن در همه گروه‌های تحت تیمار افزایش نشان دادند اما این افزایش وزن معنی‌دار نبود.

اثر بر وزن اندام‌های جنسی: وزن بیضه در گروهی که فقط سیکلوفسفامید دریافت کرده بود در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0/01$). درحالیکه در حیواناتی که همزمان با دارو، آنتی اکسیدان هم دریافت می‌کردند، این کاهش وزن به طور معنی‌داری جبران شد ($p<0/05$). وزن بیضه حیوانات تحت تیمار با جینسینگ و یا ویتامین E، در مقایسه با گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید و کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<0/01$). همانطور که در جدول ۱ هم نشان داده شده، مصرف همزمان دو آنتی اکسیدان با هم، کاهش وزن بیضه را نسبت به گروهی که فقط سیکلوفسفامید دریافت کرده بودند به طور معنی‌داری افزایش داد ($p<0/05$).

اثر بر پارامترهای اسپرم: به دنبال تجویز طولانی مدت سیکلوفسفامید تعداد اسپرم‌های مرده و اسپرم‌های بد شکل افزایش معنی‌دار و تعداد اسپرم‌های اپیدیمی در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان دادند ($p<0/01$). در گروه‌هایی که همزمان با سیکلوفسفامید، یکی از آنتی اکسیدان‌های جینسینگ و یا ویتامین E را دریافت می‌کردند، این اختلالات به طور معنی‌داری جبران شد ($p<0/01$). مصرف جینسینگ و یا ویتامین E به تنهایی، باعث افزایش

جدول ۱. اثر سیکلوفسفامید وآنتی اکسیدانتهای مصرفی بر پارامترهای حیاتی اسپرم در موش صحرایی (M±SEM)

گروه	Con	Sham	Cp	Gin	Cp+Gin	VitE	Cp+VitE	Cp+VE+Gin
تعداد ($10^6/mL$)	۲۴۹/۳۷±۳۰/۵۱	۲۳۸/۸±۴۰/۳۵	۱۳۰/۵±۲۰/۴۱^{b**}	۲۵۳/۰۶±۶۴/۶۴^{a**}	۲۲۲/۱۹±۲۵/۰۳^{a**}	۲۷۱/۷±۵۴/۶۵^{a**}	۲۱۴/۱۸±۷۵/۲۸^{a**}	۲۴۰/۳۱±۵۷/۷۸^{a*}
اسپرم بدشکل (٪)	۲۱/۲۸±۴/۴۷	۲۲/۴۷± ۳/۹۶	۶۴±۴/۹۶^{b**}	۲۰/۶۵±۲/۳۴^{a**}	۳۶/۹۲±۲/ ۲۲^{ab**}	۱۷/۹۲±۱/۲۶^{a**}	۳۴/۳۲±۵/ ۳۸^{ab**}	۲۸/۲۵± ۴/۶۴^{a**}
اسپرم مرده (٪)	۲۱/۷±۳/۲۵	۱/۵±۱۸/۷۵	۵۸/ ۶۲±۱/۶۳^{b**}	۱۳/۳۲±۱/۰۴^{ab**}	۲۲/۵۱±۳/۵۱^{a**}	۱۶/۸۵±۲/۶۷^{a**}	۲۶/۶۵±۳/۳۷^{ab**}	۲۶/۲۵±۷/۹۳^{a**}
وزن اولیه بدن (*gr*)	۲۵۲±۳۶/۰۳	۲۰۷± ۵۳/۷۷	۲۲۴±۱۳/۹۵	۲۱۶±۲۰/۵۹	۲۰۷±۱۲/ ۹۰	۲۲۶/۵±۱۳/۹۸	۲۲۴±۱۱/۳۱	۲۰۶/۵±۱۵
وزن نهایی بدن (*gr*)	۲۸۶/۵±۲۲/۵۳	۲۴۵/۷۵±۴۰/۷۲	۲۴۲±۶/۷۳	۲۹۸/۷±۹۸/۱۳	۲۳۴±۵ /۴۱	۲۹۱±۴۳/۲۲	۲۴۳/۵±۲۴/۷۲	۲۳۳/۵±۲۰/۵۵
وزن بیضه (*gr*)	۱/۴۷±۰/۰۵	۱/۵۲±۰/۲۲	۱/۲۲±۰/۰۹^{b*}	۱/۵۵±۰/۱^{a**}	۱/۴۰±۰/۰۸^{a*}	۱/۶±۰/۱۴^{a**}	۱/۳۵±۰/۱	۱/۵±۰/۱۶^{a*}
ضریب باروری(٪)	۱۰۰	۱۰۰	۵۰	۱۰۰	۷۵	۱۰۰	۸۷/۵	۱۰۰
تعداد زاده‌ها	۳۸	۴۳	۷	۴۷	۲۳	۵۰	۳۰	۴۴
تعداد ماده‌های آبستن به کل موشها	۸/۸	۸/۸	۴/۸	۸/۸	۶/۸	۸/۸	۷/۸	۸/۸

a: مقادیر فوق از نظر معنی‌دار بودن نسبت به گروه سیکلوفسفامید مقایسه شده‌اند (سطح معنی‌داری $p<0/05$)، b: مقادیر فوق از نظر معنی‌دار بودن نسبت به گروه شم مقایسه شده‌اند (سطح معنی‌داری $p<0/05$)، سطوح معنی‌داری*:($p<0/05$)، **:($p<0/01$)، Con: گروه کنترل، Sham: گروه شاهد، Cp: گروه دریافت‌کننده سیکلوفسفامید به تنهایی Gin: گروه دریافت‌کننده جینسینگ به تنهایی Cp+Gin: گروه دریافت‌کننده سیکلوفسفامید و جینسینگ، VitE: گروه دریافت‌کننده ویتامین E به تنهایی، Cp+VitE: گروه دریافت‌کننده سیکلوفسفامید و ویتامین E، Cp+VE+Gin: گروه دریافت‌کننده سیکلوفسفامید، ویتامین E و جینسینگ.

Archive of SID
www.SID.ir

معنی‌دار در تعداد اسپرم‌های اپیدیدیم و کاهش معنی‌دار در تعداد اسپرم‌های مرده و بدشکل نسبت به گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید شد ($p<۰/۰۱$). طبق نتایج موجود در جدول ۱، تعداد اسپرم‌های اپیدیدیمی، تعداد اسپرم‌های مرده و بدشکل در حیواناتی که همزمان هر دو آنتی اکسیدان را دریافت می‌کردند در مقایسه با گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید، به ترتیب افزایش و کاهش معنی‌دار نشان داد ($p<۰/۰۱$).

اثر بر شاخص‌های باروری: با توجه به کاهش تعداد اسپرم، اسپرم با شکل طبیعی و افزایش تعداد اسپرم‌های مرده در موش‌های تیمار شده با سیکلوفسفامید، کاهش در تعداد توالد، تعداد ماده‌های آبستن و میزان باروری در جنس نر در مقایسه با گروه کنترل صورت گرفت.

بحث

سیکلوفسفامید باعث بروز سمیت تولیدمثلی از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود که با تجویز همزمان آنتی اکسیدانتها این سمیت کاهش می‌یابد. توانایی سیکلوفسفامید در تولید رادیکال‌های آزاد، پراکسیداسیون چربی و بروز استرس اکسیداتیو در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی گزارش شده است (۳۶). بررسی‌های پیشین نشان می‌دهد که دوز پایین و استفاده طولانی مدت از سیکلوفسفامید در موش‌های نر می‌تواند وزن بدن و ارگان‌های تناسلی را کاهش دهد (۳۷)، در میزان باروری اختلال ایجاد کند (۳۸) و رشد و نمو نسل بعد را تغییر دهد (۳۹). به نظر می‌رسد سطح تیول داخل سلولی در تعیین حساسیت سلولها در برابر آسیب‌های القاء شده توسط سیکلوفسفامید نقش مهمی دارد (۴۰). ٤- هیدروکسی سیکلوفسفامید می‌تواند با تیول‌های سلولی واکنش دهد و مشتق تیو- آلکیلی تولید کند. مشتقات تولید شده در تعادل با ٤- هیدروکسی سیکلوفسفامید می‌باشد که از عوامل آلکیلاسیون محسوب می‌شود (۲) و می‌توانند باعث القاء استرس اکسیداتیو شوند.

نتایج در جدول ۱ نشان می‌دهد که در طول مدت تیمار، در وزن حیواناتی که سیکلوفسفامید دریافت می‌کردند، کاهشی صورت نگرفت که با مطالعات صورت گرفته در گذشته مغایرت دارد (۳۷). اما وزن بیضه در این گروه از حیوانات به طور معنی‌داری کاهش نشان داد. مطالعات صورت گرفته در گذشته یافته ما را تایید می‌کند (٤،۳۷). کاهش وزن در بیضه می‌تواند به علت کاهش تعداد سلول‌های اسپرم‌ساز، لیز شدن سلول‌های لایدیگ و سطح کاهش یافته اسپرماتوژنز باشد. با لیز شدن سلول‌های لایدیگ، میزان هورمون تستوسترون هم کاهش می‌یابد (٤۱). سطح پایین تستوسترون علاوه بر مختل کردن اسپرماتوژنز، می‌تواند بر عملکرد بافت اپیدیدیم هم اثرات منفی داشته باشد و اختلال در بلوغ و کیفیت اسپرم را به همراه داشته باشد (٤۲). همچنین این کاهش وزن ممکن است به خاطر کاهش در اندازه بیضه یا کاهش قطر لوله‌های سمی‌نیفروس، ضخامت اپیتلیال و یا افزایش در فضای بین لوله‌ای باشد که در نهایت منجر به تخریب بیضه می‌شود (٤۳).

اسپرماتوزوییید مقدار کمی ROS تولید می‌کنند که این مقدار کم نقش مهمی در فرایندهای فیزیولوژیکی اسپرم مانند ظرفیت‌یابی، واکنش‌های آکروزومی و اتصال اسپرم- تخمک ایفا می‌کند (٤۷-٤٤)، در طی فرآیند بلوغ، اسپرمها بخش زیادی از سیتوپلاسم خود را به صورت اجسام باقیمانده از دست می‌دهند و قطره سیتوپلاسمی را در قطعه میانی اسپرم ایجاد می‌کند. اسپرم‌های حاوی این قطره‌ها مراحل بلوغ خود را کامل نکرده است و از لحاظ عملکرد معیوب هستند (٤۸).

باقیمانده سیتوپلاسمی حاوی مقدار زیادی آنزیم‌های سیتوپلاسمی ویژه مانند G6PDH، SOD و آنتی اکسیدان‌های سلولی می‌باشند (٤۹). فقدان بخش عمده سیتوپلاسمی باعث کاهش سیستم دفاع آنتی اکسیدانی می‌شود. از سویی به دلیل وجود غلظت بالای اسیدهای چرب غیر اشباع در غشاء اسپرم و سطوح پائین آنزیم‌های آنتی اکسیدان، این سلولها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو بسیار حساس و آسیب‌پذیر هستند (۵۰).

مطالعات Cao و همکاران نشان دادند که با افزایش استرس اکسیداتیو، سطح آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی مهم در سلول‌های لیدیگ کاهش می‌یابد و باعث کاهش سنتز و ترشح تستوسترون می‌شود و عامل موثری جهت اختلال در

Archive of SID
www.SID.ir

اسپرمیوژنز و به تبع آن کاهش معنی‌دار در تعداد اسپرم‌های اپیدیدیمی می‌باشد (۵۱). در این مطالعه، کاهش معنی‌داری در تعداد اسپرم‌های اپیدیدیمی در حیوانات تحت درمان با CP دیده شد که داده‌های جدول ۱ گویای این مطالب می‌باشد. مطالعات Aziz و همکاران در سال ۲۰۰٤ نشان دادند که میان تولید ROS در اسپرم و نسبت اسپرم‌های بد شکل ارتباط معنی‌دار مشاهده شده است (۵۲). ایجاد سمیت مستقیم توسط سیکلوفسفامید در سلول‌های اسپرماتوژنیک، عامل مهمی در تولید اسپرم‌های مرده و بدشکل گزارش شده است (۲). داده‌های حاصل از این مطالعه هم نشان می‌دهد که تعداد اسپرم‌های بد شکل و مرده در مقایسه با گروه کنترل از افزایش معنی‌داری برخوردار بود (جدول۱).

ریزش سلول‌های اپیتلیالی معمولاً باعث آسیب به سلول‌های سرتولی شده و پل‌های سیتوپلاسمی را متلاشی کرده در نتیجه می‌تواند باعث کاهش در تعداد اسپرم و افزایش بدشکلی‌های اسپرم شود. آتروفی لوله‌های سمی‌نیفر و سلول‌های اسپرماتوژنیک منجر به افزایش ناهنجاری‌های مورفولوژیک در اسپرم می‌شود.

یافته‌های به دست آمده نشان می‌دهد که در حیوانات تحت درمان با CP، کاهش در توان باروری، تعداد ماده‌های آبستن و تعداد نوزادان متولد شده پدید آمده است. این تغییرات با کاهش وزن ارگان‌های جنسی و کاهش تعداد اسپرم‌های اپیدیدیمی به همراه افزایش معنی‌دار تعداد اسپرم‌های مرده و بدشکل در ارتباط نزدیک می‌باشد.

ویتامین E در سال ۱۹٤۰ به عنوان یک آنتی اکسیدان چربی دوست و قوی معرفی و مشخص شد که برای حفظ فرایند اسپرماتوژنز در پستانداران ضروری است (۵۲). Ghosh و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که استرس اکسیداتیو القاء شده توسط سیکلوفسفامید و اختلالات آن توسط ویتامین E مهار می‌شود (۱۳). ویتامین E با افزایش سیستم آنتی اکسیدانی باعث افزایش قابلیت حیات اسپرم می‌شود (٥٤). کمبود این ویتامین منجر به واکنش‌های استرس اکسیداتیو در بافت بیضه و در نتیجه کاهش در سنتز تستوسترون و اسپرماتوژنز می‌گردد (۵۲). همچنین با افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و کاهش تولید ROS (۵۵) و حذف رادیکال‌های پروکسیل ($RO^{\cdot}$) و آلکواکسیل ($ROO^{\cdot}$) (٤٦)، اپیدیدیم را در برابر پراکسیداسیون لیپیدها محافظت می‌کند و از این طریق باعث افزایش باروری می‌شود.

ویتامین E پراکسیداسیون چربیها را در میتوکندری و میکروزوم بیضه مهار کرده (۵٦،۵۷) اثرات مخرب استرس اکسیداتیو ناشی از عوامل استرس‌زا را کاهش می‌دهد (٦٤-۵۸).

Kim در سال ۱۹۹۱ نشان داد که سیکلوفسفامید باعث القاء سمیت در سیستم ایمنی موجوداتی که در معرض این ترکیب قرار می‌گیرند، می‌شود. همچنین گزارش کردند که این سمیت توسط جینسینگ کاهش می‌یابد (٦۵). Kang و همکاران در سال ۲۰۰۲ گزارش کردند که جینسینگ دارای اثرات حمایتی و درمانی بر علیه اختلالات بیضوی ناشی از ۲،۳،۷،۸- تتراکلرودی بنزو - پی - دی اکسین می‌باشد (٦٦) که البته یافته‌های حاضر نیز نشان می‌دهد که جینسینگ می‌تواند اثرات سمی سیکلوفسفامید در دستگاه تناسلی نر را کاهش دهد. خاصیت آنتی اکسیدانی جینسینگ از طریق تحریک فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند گلوتاتیون و سوپراکسید دسموتاز می‌باشد (٦۷-٦۹) و با فعالیت آنتی اکسیدانتی خود می‌تواند از بین برنده سوپراکسیدها باشد همچنین با مهار فعالیت رادیکال‌های هیدروکسیل و آنیونها از پراکسیداسیون لیپیدها در غشاء سلول جلوگیری می‌کند (۷۰).

نتایج بدست آمده فرضیات مختلفی را در اثرات مثبت آنتی اکسیدانی جینسینگ و ویتامین E بر باروری پیشنهاد می‌کنند. یک فرضیه این است که آنتی اکسیدان‌های مصرفی در این پژوهش دارای توانایی بالقوه‌ای در بهبود فرایند اسپرماتوژنز و کاهش عوارض جانبی سیکلوفسفامید دارند. این آنتی اکسیدانها با افزایش کیفیت اسپرم، باعث بهبود پارامترهای مختلف باروری می‌شوند. فرضیه دیگر پیشنهاد می‌کند که این آنتی اکسیدانها با اثر بر سلول‌های اسپرماتوژنیک و سرتولی، سطح تستوسترون را افزایش می‌دهند و باعث حفظ سلامت سیستم تولید مثلی نر و به تبع آن بهبود اسپرماتوژنز می‌شوند.

Archive of SID
www.SID.ir

نتیجه گیری

اگرچه مطالعاتی وجود دارند که میزان اثرات آنتی اکسیدانی ویتامین E و یا اثرات حفاظتی جینسینگ را بیان می‌کنند ولی استفاده از این ترکیبات برای پیشگیری از عوارض ترکیبات شیمی درمانی کمتر مورد توجه قرار گرفته است. بسیاری از داروهای شیمی درمانی روی تقسیم سلولی در سلولها، به خصوص سلول‌هایی که سرعت تقسیم در آنها بالا است مانند سلول‌های جنسی اثر می‌گذارند. سیکلوفسفامید به عنوان یک داروی شیمی درمانی، ضمن تخریب DNA سلول‌های سرطانی و مهار آنها، با تولید رادیکال‌های آزاد قادر به ایجاد استرس اکسیداتیو در بافتها می‌باشد. لذا شواهد و مدارک به دست آمده تا به امروز نشان می‌دهند که استفاده از آنتی اکسیدانها می‌توانند با از بین بردن رادیکال‌های آزاد تولید شده، در جلوگیری و کاهش اثرات سمی ترکیبات شیمی درمانی موثر واقع شوند. امروزه بحث ادجوانت دارویی یا داشتن ترکیباتی از مخلوط داروها که بتوانند اثرات همدیگر را بهبود بخشیده یا تقویت کنند از مباحث عمده علوم فارماکولوژی است. بررسی نتایج حاضر در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید، ویتامین E و جینسینگ به طور همزمان نشان می‌دهد که ویتامین E و جیسنگ اثرات سینرژیستی روی هم ندارند و احتمالاً از مکانیسم‌های متفاوتی برای تاثیر استفاده می‌کنند. به نظر می‌رسد استفاده از سایر دوزهای دارویی این دو ترکیب شاید بتواند بر هم کنش این آنتی اکسیدانها را بهتر آشکار نماید.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از تمامی دوستان و همکاران گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه که در انجام این پروژه همکاری داشته‌اند تشکر می‌گردد.

References

1. Dollery CT. Cyclophosphamide. In: Dollery CT, editors. Therapeutic drugs. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1999. p. 349-53.
2. 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):115-81.
3. Haque R, Bin-Hafeez B, Ahmad I, Parvez S, Pandey S, Raisuddin S. Protective effects of Emblica officinalis Gaertn. in cyclophosphamide-treated mice. Hum Exp Toxicol. 2001;20(12):643-50.
4. 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):201-7.
5. Ghosh D, Das UB, Ghosh S, Mallick M, Debnath J. Testicular gametogenic and steroidogenic activities in cyclophosphamide treated rat: a correlative study with testicular oxidative stress. Drug Chem Toxicol. 2002;25(3):281-92.
6. Hemminki K, Kallama S. Reactions of nitrogen mustards with DNA. IARC Sci Publ. 1986;(78):55-70.
7. Hengstler JG, Fuchs J, Tanner B, Oesch Bartlomowicz 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.
8. Qiu J, Hales BF, Robaire B. Damage to rat spermatozoal DNA after chronic cyclophosphamide exposure. Biol Reprod. 1995;53(6):1465-73.
9. Arumugam N, Sivakumar V, Thanislass J, Devaraj H. Effects of acrolein on rat liver antioxidant defense system. Indian J Exp Biol. 1997;35(12):1373-4.
10. Mythili Y, Sudharsan PT, Selvakumar E, Varalakshmi P. Protective effect of DL-alpha-lipoic acid on cyclophosphamide induced oxidative cardiac injury. Chem Biol Interact. 2004;151(1):13-9.
11. Kern JC, Kehrer JP. Acrolein-induced cell death: a caspase-influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis. Chem Biol Interact. 2002;139(1):79-95.
12. 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):201-7.
13. Ghosh D, Das UB, Misro M. Protective role of alpha-tocopherol-succinate (provitamin-E) in cyclo phosphamide induced testicular gametogenic and

Archive of SID
www.SID.ir

steroidogenic disorders: a correlative approach to oxidative stress. Free Radic Res. 2002;36(11): 1209-18.

14. Ocollura J. Ginseng tonic of life. Vegetarian Times. 1997;235:94.
15. Hu SY. A contribution to our knowledge of ginseng. Am J Chin Med (Gard City N Y). 1977;5(1): 1-23.
16. Kumar A. Chemopreventive action of ginseng on DMBA induced skin papillomagenesis in the skin of Swiss albino mice. Proceedings of the 6th International Ginseng Symposium; 1993 Sept 6-9; Seoul Olympic Parktel. Seoul, Korea: Korea Ginseng & Tobacco Research Institute; 1993. P. 66-8.
17. Cheng LQ, Kim MK, Lee JW, Lee YJ, Yang DC. Conversion of major ginsenoside Rb1 to ginsenoside F2 by Caulobacter leidyia. Biotechnol Lett. 2006;28:1121-1127.
18. Helms S. Cancer prevention and therapeutics: Panax ginseng. Altern Med Rev. 2004;9(3):259-74.
19. Kitts D, Hu C. Efficacy and safety of ginseng. Public Health Nutr. 2000;3(4A):473-85.
20. Chang YS, Seo EK, Gyllenhaal C, Block KI. Panax ginseng: a role in cancer therapy? Integr Cancer Ther. 2003;2(1):13-33.
21. Benishin CG, Lee R, Wang LC, Liu HJ. Effects of ginsenoside Rb1 on central cholinergic metabolism. Pharmacology. 1991;42(4):223-9.
22. Saito H, Tsuchiya M, Naka S, Takagi K. Effects of Panax Ginseng root on conditioned avoidance response in rats. Jpn J Pharmacol. 1977;27(4):509-16.
23. Scott GI, Colligan PB, Ren BH, Ren J. Ginsenosides Rb1 and Re decrease cardiac contraction in adult rat ventricular myocytes: role of nitric oxide. Br J Pharmacol. 2001;134(6):1159-65.
24. Mahady GB, Gyllenhaal C, Fong HHS, Farnsworth NR. Ginsengs: A review of safety and efficacy. Nutr Clin Care. 2000;3(2):90-101.
25. Vogler BK, Pittler MH, Ernst E. The efficacy of ginseng. A systematic review of randomised clinical trials. Eur J Clin Pharmacol. 1999;55(8):567-75.
26. Bastianetto S, Zheng WH, Quirion R. The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C. J Neurochem. 2000;74(6):2268-77.
27. Shin HR, Kim JY, Yun TK, Morgan G, Vainio H. The cancer-preventive potential of Panax ginseng: a review of human and experimental evidence. Cancer Causes Control. 2000;11(6):565-76.
28. Gurel A, Coskun O, Armutcu F, Kanter M, Ozen OA. Vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in frontal cortex and hippocampus: biochemical and histological studies. J Chem Neuroanat. 2005;29(3):173-8.
29. Nouri M, Ghasemzadeh A, Farzadi L, Shahnazi V, Ghaffari Novin M. Vitamins C, E and lipid peroxidation levels in sperm and seminal plasma of asthenoteratozoospermic and normozoospermic men. Iran J Reprod Med. 2008;6(1):1-5.
30. Yoganathan T, Eskild W, Hansson V. Investigation of detoxification capacity of rat testicular germ cells and Sertoli cells. Free Radic Biol Med. 1989; 7(4):355-9.
31. Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A. Vitamin E: protective role of a Janus molecule. FASEB J. 2001;15 (13):2314-25.
32. Sabik LME, Abd El-Rahman SS. Alpha-tocopherol and ginger are protective on Cyclophosphamide-induced gonadal toxicity in adult male albino rats. Basic Appl Pathol. 2009;2(1):21-9.
33. Codrington AM, Hales BF, Robaire B. Spermiogenic germ cell phase–specific DNA damage following cyclophosphamide exposure. J Androl. 2004;25(3):354-62.
34. Codrington AM, Hales BF, Robaire B. Exposure of male rats to cyclophosphamide alters the chromatin structure and basic proteome in spermatozoa. Hum Reprod. 2007;22(5):1431-42.
35. Rezvanfar M, Sadrkhanlou R, Ahmadi A, Shojaei-Sadee H, Rezvanfar M, Mohammadirad A, et al. 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):901-10.
36. Lear L, Nation RL, Stupans I. Effects of cyclophosphamide and adriamycin on rat hepatic microsomal glucuronidation and lipid peroxidation. Biochem Pharmacol. 1992;44(4):747-53.
37. 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):201-7.
38. Higuchi H, Nakaoka M, Katsuda Y, Kawamura S, Kato T, Matsuo M. Collaborative assessment of optimal administration period and parameters to detect effects on male fertility in the rat: effects of

www.SID.ir

cyclophosphamide on the male reproductive system. J Toxicol Sci. 1995;20(3):239-49.

39. Robaire B, Hales BF. Mechanisms of action of cyclophosphamide as a male-mediated developmental toxicant. Adv Exp Med Biol. 2003;518: 169-80.

40. Moore HD, Akhondi MA. In vitro maturation of mammalian spermatozoa. Rev Reprod. 1996;1(1): 54-60.

41. Debnath D, Mandal TK. Study of quinalphos (an environmental oestrogenic insecticide) formulation (Ekalux 25 E.C.)-induced damage of the testicular tissues and antioxidant defence systems in Sprague Dawley albino rats. J Appl Toxicol. 2000;20(3): 197-204.

42. Robaire B, Hermo L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In: Knobil E, Neill JD, editors. The physiology of reproduction. New York: Raven Press; 1988. p. 999-1080.

43. de Jager C, Bornman MS, van der Horst G. The effect of p-nonylphenol, an environmental toxicant with oestrogenic properties, on fertility potential in adult male rats. Andrologia. 1999;31(2):99-106.

44- Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. Urol Clin North Am. 2002;29(4):817-27.

45- Agarwal A, Allamaneni SS. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. Reprod Biomed Online. 2004;9(3):338-47.

46- Sies H. Strategies of antioxidant defense. Eur J Biochem. 1993;215(2):213-9.

47- Lewis SE, Boyle PM, McKinney KA, Young IS, Thompson W. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. Fertil Steril. 1995;64(4):868-70.

48- Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. Biol Reprod. 1997;56(4):1020-4.

49- Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. J Androl. 1996;17(3):276-87.

50- Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. Fertil Steril. 1992;57(2):409-16.

51- Cao L, Leers-Sucheta S, Azhar S. Aging alters the functional expression of enzymatic and non-enzymatic anti-oxidant defense systems in testicular rat Leydig cells. J Steroid Biochem Mol Biol. 2004;88(1):61-7.

52- Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ Jr, et al. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. Fertil Steril. 2004;81(2): 349-54.

53- Johnson FC. The antioxidant vitamins. CRC Crit Rev Food Sci Nutr. 1979;11(3):217-309.

54- Verma A, Kanwar KC. Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. Asian J Androl. 1999;1(3):151-4.

55- Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. J Reprod Fertil. 1987;81(2):459-69.

56- Lucesoli F, Fraga CG. Oxidative stress in testes of rats subjected to chronic iron intoxication and alpha-tocopherol supplementation. Toxicology. 1999;132(2-3):179-86.

57- Gavazza MB, Catalá A. The effect of alpha-tocopherol on lipid peroxidation of microsomes and mitochondria from rat testis. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2006;74(4):247-54.

58- Senthil kumar J, Banudevi S, Sharmila M, Murugesan P, Srinivasan N, Balasubramanian K, et al. Effects of Vitamin C and E on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress, androgen binding protein and lactate in rat Sertoli cells. Reprod Toxicol. 2004;19(2):201-8.

59- Sen Gupta R, Sen Gupta E, Dhakal BK, Thakur AR, Ahnn J. Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. Mol Cells. 2004;17(1):132-9.

60- Verma RJ, Nair A. Ameliorative effect of vitamin E on aflatoxin-induced lipid peroxidation in the testis of mice. Asian J Androl. 2001;3(3):217-21.

61- Latchoumycandane C, Mathur PP. Effects of vitamin E on reactive oxygen species-mediated 2,3, 7,8-tetrachlorodi-benzo-p-dioxin toxicity in rat testis. J Appl Toxicol. 2002;22(5):345-51.

62- Manna I, Jana K, Samanta PK. Intensive swimming exercise-induced oxidative stress and repro-

www.SID.ir

ductive dysfunction in male wistar rats: protective role of alpha-tocopherol succinate. Can J Appl Physiol. 2004;29(2):172-85.

63- Jedlinska-Krakowska M, Bomba G, Jakubowski K, Rotkiewicz T, Jana B, Penkowski A. Impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testes morphology in rats. J Reprod Dev. 2006;52(2):203-9.

64- Zhou DX, Qiu SD, Zhang J, Tian H, Wang HX. The protective effect of vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in the testes of adult rats. Asian J Androl. 2006;8(5):584-8.

65- Kim YS, Kang KS, Kim SI. Effects of ginseng components on immunotoxicity of cyclophosphamide. Kor J Ginseng Sci1991;15:13-20.

66- Kang J, Lee Y, No K, Jung E, Sung J, Kim Y, et al. Ginseng intestinal metabolite-I (GIM-I) reduces doxorubicin toxicity in the mouse testis. Reprod Toxicol. 2002;16(3):291-8.

67- Kang KS, Kim HY, Pyo JS, Yokozawa T. Increase in the free radical scavenging activity of ginseng by heat-processing. Biol Pharm Bull. 2006;29(4): 750-4.

68- Liu ZQ, Luo XY, Liu GZ, Chen YP, Wang ZC, Sun YX. In vitro study of the relationship between the structure of ginsenoside and its antioxidative or prooxidative activity in free radical induced hemolysis of human erythrocytes. J Agric Food Chem. 2003;51(9):2555-8.

69- Naval MV, Gómez-Serranillos MP, Carretero ME, Villar AM. Neuroprotective effect of a ginseng (Panax ginseng) root extract on astrocytes primary culture. J Ethnopharmacol. 2007;112(2):262-70.

70- Attele AS, Wu JA, Yuan CS. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. Biochem Pharmacol. 1999;58(11):1685-93.

Archive of SID

www.SID.ir