

Research Paper

Protective Effects of Hydroalcoholic Extract of Achillea Millefolium on In-vitro Fertilization in Streptozotocin-Induced Diabetic Male Mice



*Mohammadreza Hosseini¹, Gholamreza Najafi²

1. Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.

2. Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.



Citation Hosseini M & Najafi Gh. [Protective Effects of Hydroalcoholic Extract of Achillea Millefolium on In-vitro Fertilization in Streptozotocin-Induced Diabetic Male Mice (Persian)]. *Qom Univ Med Sci J.* 2023; 16(11):928-941. <https://doi.org/10.32598/qums.16.11.2747.1>

 <https://doi.org/10.32598/qums.16.11.2747.1>



Received: 14 Oct 2022

Accepted: 29 Nov 2022

Available Online: 01 Feb 2023

Keywords:

Spermatozoa,
Achillea millefolium,
In-vitro fertilization,
Diabetes Mellitus,
Mice

ABSTRACT

Background and Objectives Diabetes is one of the determining factors in fertility that causes disturbances in spermatogenesis, ovulation and embryo formation. Achillea Millefolium (AM), as a medicinal plant with strong antioxidant and anti-inflammatory properties, is used to treat many diseases. This study aims to evaluate the protective effect of AM hydroalcoholic extract on sperm parameters and In-Vitro Fertilization (IVF) rate in mice.

Methods In this study, 40 mice were divided into five groups; control group, diabetic group, diabetic+low AM (receiving 37.5 mg/kg of AM extract daily), diabetic+moderate AM (receiving 75 mg/kg of AM extract daily) and diabetic+high AM (receiving 150 mg/kg of AM extract daily). After the 30-day treatment period, the mice were euthanized and the parameters of total sperm count, percentage of live sperms, percentage of immature sperms, percentage of sperms with damaged DNA, and IVF rate were evaluated. Statistical analysis was done by one-way analysis of variances and Tukey's post hoc test.

Results The sperm count, percentage of live sperms, IVF rate, percentage of two-cell embryos, and percentage of blastocysts decreased significantly in the diabetic group compared to the control group. In all three groups received AM extract (37.5, 75, and 150 mg/kg), an increase in the number of sperms, percentage of live sperms, and the IVF rate was observed, but this increase was significant only in the diabetic group received 150 mg/kg AM extract compared to the control group. No significant difference was observed between the three groups received AM.

Conclusion The AM hydroalcoholic extract can improve sperm parameters and IVF rate due to its antioxidant properties.

* Corresponding Author:

Mohammadreza Hosseini, Assistant professor.

Address: Department of Basic Science, Faculty of Veterinary medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.

Tel: +98 (901) 3318690

Email: hosseini7a@gmail.com



Copyright © 2023 Qom University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).
Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Extended Abstract

Introduction

Diabetes is a chronic diseases characterized by chronic hyperglycemia which may have adverse effects on male reproductive function. *Achillea Millefolium* (AM), a medicinal plant used for over 3000 years, have been shown to have anti-inflammatory, antitumor, antimicrobial and antioxidant properties. The main compounds found in this plant include volatile oils, poly-phenol, flavonoids, sesquiterpene, betaine and tannins. This study aims to examine the effect of AM hydroalcoholic extract on sperm parameters and In-vitro fertilization (IVF) of diabetic mice.

Methods

In this study, 40 adult male Syrian mice (weighing 30 ± 5 g) were kept in the Laboratory Animal House of Urmia University at a temperature of 21 ± 2 °C and 12/12 light-dark cycle, fed with a standard pellet diet and had free access to water. The mice were randomly divided into five groups ($n=8$), including control group (receiving 0.20 mL physiological serum orally), diabetic group (receiving a single intraperitoneal injection of Streptozotocin at a dose of 45 mg/kg), diabetic+low AM (receiving Streptozotocin plus 37.5 mg/kg of AM hydroalcoholic extract by gavage for 30 days), diabetic+moderate AM , (receiving Streptozotocin plus 75 mg/kg of AM hydroalcoholic extract by gavage for 30 days), and diabetic+high AM (receiving Streptozotocin plus 150 mg/kg of AM hydroalcoholic extract by gavage for 30 days).

After anesthesia with a ketamine/xylazine solution, mice were euthanized by dislocation of their cervical vertebrae and their testis and epididymis were removed and placed in 1 mL of Human Tubal Fluid (HTF) medium. The tail of epididymis was cut into three parts and incubated at 37 °C for 30 min using a 5% CO₂ incubator to allow sperms to swim out of the epididymal tubules. Sperm concentration was determined using a hemacytometer (Neubauer, HBG, Germany). After preparing a 1:20 dilution from the epididymal sperm, about 10 µL of this diluted specimen was transferred to the hemocytometer. The sediment sperms during this time were counted with a light microscope at $\times 400$ and expressed as the number of sperm per mL of suspension ($n \times 50000 \times d$), where, n is the number of counted sperms and d is the reverse of dilution. Sperm suspension was stained with Eosin-Nigrosin staining technique. Slides were viewed by light microscope. Dead sperms appeared pink and live sperms were not stained.

Sperm smear was prepared, dried and fixed by the glutaraldehyde for 30 min. Then, the smears were stained by 5% aniline blue for 5-8 min and the percentage of mature sperms (with colorless head) and immature sperm (with blue head) were observed by using a light microscope. For assessment of sperm DNA integrity, dried smears were fixed in methanol. Then, the slides were stained with Acridine orange. Sperms without damaged DNA (with green color) and with damaged DNA (with orange color) were observed by a florescent microscope. Female mice were super ovulated with intraperitoneal injection of 10 IU of PMSG (Pregnant mare serum gonadotropin) hormone and 10 IU of HCG (Human chorionic gonadotropin) hormone. After 12 hr of HCG injection, oocytes of mice were collected by dissecting from ampulla of the oviduct and transferred to the fertilization droplet. Then, sperms were added to the fertilization medium ($1 \times 10^6/1$ mL of HTF). Fertilization rate was determined about 6 hours after releasing the sperm by observing two pronuclei. In addition, the formation of two-cell embryos and blastocysts were evaluated. The data for various sperm and IVF parameters were expressed as Mean $\pm$ SD and were compared by using one-way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons. $P < 0.05$ was statistically significant.

Results

The results revealed that sperm count and percentage of sperm viability decreased, and the percentage of mature sperm and sperm with damaged DNA increased significantly in the diabetic group compared to the control group ($P < 0.05$). Sperm count and percentage of sperm viability increased significantly in the diabetic+high AM in comparison with the diabetic group. There was no significant difference in sperm maturity among the groups received low, moderate, and high doses of AM and the diabetic group ($P \geq 0.05$). Percentage of sperms with DNA damage in the groups received low, moderate, and high doses of AM decreased significantly in comparison with the diabetic group ($P < 0.05$).

The diabetic group showed a significant decrease in fertilization rate, percentage of two-cell embryos, percentage of blastocysts, and percentage of hatched embryos ($P < 0.05$) and a significant increase in the percentage of arrested embryos ($P < 0.05$) in comparison with the control group. The increase of fertilization rate, percentage of two-cell embryos, percentage of blastocysts, and percentage of hatched embryos was significant only in the diabetic+high AM group in comparison with the diabetic group ($P < 0.05$). In the diabetic groups received AM no significant decrease was observed in the percentage of arrested embryos ($P \geq 0.05$) in comparison with the diabetic group.

Discussion

This study demonstrated the protective effect of AM on reproductive system dysfunction caused by streptozotocin-induced diabetes. Streptozotocin-induced diabetes leads to increased sperm with DNA damage and immature sperm, and decreased sperm count and sperm viability, leading to low fertility parameters such as infertility rate and embryo development. The AM hydroalcoholic extract can strongly ameliorate these parameters.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the ethics committee of [Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University](#) (Code: AP/1286/3).

Funding

This study was funded by [Islamic Azad University of Urmia Branch](#).

Authors contributions

All authors contributed equally in preparing all parts of the research.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Ali Karimi.

مقاله پژوهشی

اثرات محافظتی عصاره هیدروالکلی بومادران بر توان باروری برونتنی در موش‌های سوری نر دیابتی شده با استرپتوزوسین

*محمدرضا حسینچی^۱، غلامرضا نجفی^۲

۱. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

۲. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.



Citation Hosseini M & Najafi Gh. [Protective Effects of Hydroalcoholic Extract of Achillea Millefolium on In-vitro Fertilization in Streptozotocin-Induced Diabetic Male Mice (Persian)]. *Qom Univ Med Sci J.* 2023; 16(11):928-941. <https://doi.org/10.32598/qums.16.11.2747.1>

doi <https://doi.org/10.32598/qums.16.11.2747.1>

چکیده

زمینه و هدف: دیابت یکی از عوامل تأثیرگذار بر روند در باروری محسوب می‌شود که می‌تواند باعث اختلال در روند اسپرماتوز، تخمک‌گذاری و تشکیل جنین شود. دیابت یک بیماری است که اندام‌های مختلف بدن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر محافظتی عصاره هیدروالکلی بومادران بر روی پارامترهای اسپرم و توان باروری برونتنی در موش سوری دیابتی شده است. بومادران به‌عنوان یک گیاه دارویی با دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی قوی و ضدالتهابی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها د مورد استفاده قرار می‌گیرد.

روش بررسی: در این مطالعه، ۴۰ موش سوری به ۵ گروه شامل کنترل، دیابتی، دیابتی+بومادران (۳۷/۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن روزانه)، دیابتی+بومادران (۷۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن روزانه) و گروه دیابتی+بومادران (۱۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن روزانه) تقسیم شدند. بعد از اتمام دوره تیمار ۳۰ روزه، موش‌ها آسان‌کشی شدند و پارامترهای تعداد کل اسپرم، درصد اسپرم‌های زنده، درصد اسپرم‌های نابالغ، درصد اسپرم‌های با DNA آسیب‌دیده همچنین توان باروری برونتنی مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین بین گروه‌ها از تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد.

یافته‌ها: مشخص شد در گروه دیابتی تعداد اسپرم، درصد اسپرم‌های زنده، درصد لقاح و درصد جنین‌های مرحله دوسلولی و بلاستوسیست کاهش یافته و اختلاف معناداری را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد اما در هر ۳ گروه دیابتی+بومادران با دزهای (۳۷/۵، ۷۵ و ۱۵۰) افزایش در تعداد اسپرم و درصد اسپرم‌های زنده و همچنین درصد لقاح مشاهده شد که این افزایش اختلاف معناداری را فقط در دز ۱۵۰ میلی گرم در مقایسه با گروه دیابتی داشت ($P < 0/05$)، اما هیچ اختلاف معناداری مابین ۳ گروه دیابتی+بومادران مشاهده نشد ($P \geq 0/05$).

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی بومادران به دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی می‌تواند باعث بهبود پارامترهای اسپرمی و توان باروری در موش‌های دیابتی شود.

تاریخ دریافت: ۲۲ مهر ۱۴۰۱

تاریخ پذیرش: ۰۸ آذر ۱۴۰۱

تاریخ انتشار: ۱۲ بهمن ۱۴۰۱

کلیدواژه‌ها:

اسپرماتوزوئیدها،
گل بومادران، توان
باروری برونتنی، دیابت
میلیتوس، موش سوری

* نویسنده مسئول:

محمدرضا حسینچی

نشانی: ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه.

تلفن: ۳۳۱۸۶۹۰ (۹۰۱) ۹۸+

رایانامه: hosseini7a@gmail.com

Copyright © 2023 Qom University of Medical Sciences.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

مقدمه

دیابت یکی از شایع‌ترین بیماری‌های غدد درون‌ریز بدن است که اثرات مخربی بر عملکرد جنسی مردان و زنان داشته است. این بیماری با ایجاد تغییرات در تعداد اسپرم‌ها، قدرت حرکت اسپرم‌ها، رشد فولیکولی، بلوغ اووسیت، کاهش و یا عدم تخمک‌گذاری باعث اختلال در عملکرد بیضه‌ها و تخمدان‌ها می‌شود. این تغییرات ناشی از ایجاد اختلال در محور هیپوتالاموسی-هیپوفیزی، بیضه و تخمدان می‌باشد؛ در نتیجه آن میزان هورمون‌های جنسی کاهش می‌یابد و به دنبال آن اختلال در روند تولید سلول‌های جنسی و باروری اتفاق می‌افتد. امروزه به‌طور کامل ثابت شده است که در صورتی که دیابت به‌طور قطعی درمان نشود، عملکرد دستگاه تناسلی را تحت تأثیر قرار می‌دهد که این امر موجب اختلال دستگاه تناسلی و فعالیت‌های جنسی با درجات مختلف در بیماران می‌شود [۱، ۲].

سابقه درمان بیماری‌ها با گیاهان دارویی به گذشته‌های خیلی دور برمی‌گردد. استفاده از گیاهان دارویی به‌منظور درمان، سابقه طولانی در تاریخ زندگی انسان دارا می‌باشد. گیاه بومادران با نام علمی 'معلق به راسته آستراسه' ۲ و تیره کاسنی است و معمولاً سرشاخه‌های گلدار این گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرد. این قسمت از گیاه دارای طعمی تلخ و بوی قوی می‌باشد. در طب سنتی و مدرن استفاده‌های گوناگونی برای گیاه بومادران بیان شده است که از این جمله می‌توان به استفاده کلینیکی این گیاه در توقف و تخریب سلول‌های سرطانی اشاره کرد. تاکنون بیش از ۱۰۰ ترکیب بیولوژیک فعال در این گیاه شناسایی شده است که مهم‌ترین آن‌ها شامل روغن‌های فرار، ترکیبات پلی فنلی، انواع فلاونوئیدها، سسکوئیدی‌ترین^۳، لاکتون، بتائین، ترکیبات استیلن، رزین، تانن، آشیلین، فسفات، نیترات، نمک‌های پتاسیم و اسیدهای آلی می‌باشند [۳، ۴].

این گیاه ویژگی ضدآپوپتوزی دارد و فعالیت‌های آنتی اکسیدانی آن نتیجه عملکرد ترکیبات فنلی و فلاونوئیدهای آن است. در مطالعات قبلی، مؤثر بودن عصاره گل بومادران در درمان و توقف فعالیت سلول‌های سرطانی، خاصیت ضدادام و ضدالتهابی آن به ترکیب سسکوئیدی‌ترین‌های موجود در این گیاه نسبت داده شده است [۵، ۶]. مطالعات قبلی انجام‌شده در مورد تأثیر این گیاه بر روی سیستم تولیدمثلی، نتایج ضد و نقیضی در دسترس قرار می‌دهد، به‌طوری‌که در یک مطالعه مشخص شده است که عصاره هیدرالکلی گیاه بومادران می‌تواند موجب افزایش کیفیت اسپرم در رت‌های تحت تیمار با نیکوتین باشد. این خاصیت به دارا بودن ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قابل‌ملاحظه این گیاه نسبت داده می‌شود [۷]. باوجوداین، مطالعات دیگری نیز وجود دارند که نشان

می‌دهند عصاره گل بومادران دارای اثر آنتی‌اسپرماتوزنیک می‌باشد [۸، ۹]. بنابراین در این مطالعه اثرات عصاره هیدرالکلی گل بومادران در ۳ دُز مختلف بر روی تغییرات پارامترهای اسپرمی و توان باروری درون‌تنی (که شاخص‌های مهمی برای باروری جنس نر هستند و می‌تواند اطلاعات مفیدی در ارتباط با پتانسیل باروری حیوانات ارائه دهند) در موش‌های دیابتی بررسی شد.

روش بررسی

حیوانات مورد مطالعه

در این مطالعه تجربی، تعداد ۴۰ قطعه موش سوری نر بالغ با متوسط وزن 30 ± 5 گرم در خانه حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه ارومیه تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای 21 ± 2 نگهداری شدند. غذای آن‌ها ترکیبی از گندم، ذرت و پلیت بوده و آب به‌صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار داده شد. در این مطالعه موش‌ها به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی به شرح زیر تقسیم شدند:

گروه کنترل

در این گروه، موش‌ها سرم فیزیولوژی را به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر به‌صورت خوراکی به‌مدت ۳۰ روز دریافت کردند.

گروه دیابتی

در این گروه موش‌ها توسط استرپتوزوتوسین^۴ با دُز ۴۵ میلی‌گرم میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن با تزریق داخل صفاقی دیابتی شدند.

گروه دیابتی+بومادران دُز پایین (۵/۳۷)

در این گروه موش‌های دیابتی، بومادران را با دُز ۳۷/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت خوراکی از طریق گاواژ به‌مدت ۳۰ روز دریافت کردند.

گروه دیابتی+بومادران دُز متوسط (۷۰)

در این گروه موش‌های دیابتی، بومادران را با دُز ۷۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت خوراکی از طریق گاواژ به‌مدت ۳۰ روز دریافت کردند.

گروه دیابتی+بومادران دُز بالا (۱۵۰)

در این گروه، موش‌های دیابتی، بومادران را با دُز ۱۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت خوراکی از طریق گاواژ به‌مدت ۳۰ روز دریافت کردند.

1. Achillea millefolium
2. Asteraces
3. Sesquiterpene

4. Streptozotocin (STZ)

به لام هموسیتومتر انتقال داده شد. با استفاده از فرمول شماره ۱ تعداد اسپرم در هر میلی لیتر از محیط کشت به دست آمد.

۱. تعداد اسپرم در هر میلی لیتر از محیط کشت عکس رقت $\times 5000$ تعداد اسپرم در ۵ خانه

ارزیابی درصد اسپرم‌های زنده

با استفاده از رنگ آمیزی اتوزین-نگروژین اسپرم‌های زنده و مرده مورد بررسی قرار گرفتند. در این رنگ آمیزی، اسپرم‌های زنده رنگ اتوزین را به خود نمی گیرند. در نتیجه در زیر میکروسکوپ سر اسپرم‌ها بی رنگ مشاهده می شود، اما اسپرم‌های مرده رنگ اتوزین را به خود می گیرند و سر این اسپرم‌ها به رنگ قرمز قابل مشاهده می باشد.

ارزیابی درصد اسپرم‌های نابالغ

رنگ آمیزی آنیلین بلو برای بررسی اسپرم‌های بالغ و نابالغ مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا از اسپرم‌های موجود در محیط کشت اسمیر تهیه شد. سپس اسمیرها خشک و توسط محلول گلو تار آلد هید ۳ درصد به مدت نیم ساعت فیکس شدند. در ادامه، اسمیرها توسط رنگ آنیلین بلو ۵ درصد (با استفاده از اسید استیک ۴ درصد) به مدت ۵ الی ۸ دقیقه رنگ آمیزی و درصد اسپرم‌های بالغ با سر بی رنگ و اسپرم‌های نابالغ با سر آبی رنگ به کمک میکروسکوپ نوری به دست آمد [۱۱].

ارزیابی اسپرم‌ها با DNA آسیب دیده

جهت شناسایی اسپرم‌های دارای کروماتین سالم و اسپرم‌های دارای DNA آسیب دیده از رنگ آمیزی آکریدین اورنج استفاده شد. این رنگ آمیزی برای تفریق DNA سالم و دو رشته ای از DNA تک رشته ای مورد استفاده قرار می گیرد. در این رنگ آمیزی اسپرم‌های دارای DNA سالم در زیر میکروسکوپ فلورسنت به رنگ سبز و اسپرم‌ها با DNA آسیب دیده به رنگ نارنجی تا قرمز مشاهده می شوند. برای این منظور اسمیرها ابتدا با استفاده از الکل متانول فیکس شدند. سپس لام‌ها با استفاده از آکریدین اورنج رنگ آمیزی شدند و در زیر میکروسکوپ فلورسنت مورد ارزیابی قرار گرفتند [۱۲].

ارزیابی رشد جنین‌ها و بررسی توان باروری درون تنی

تخمک گیری از موش‌های سوری ماده

برای به دست آوردن تخمک جهت بررسی توان باروری برون تنی، ابتدا به موش‌های سوری ماده بالغ با سن ۸ هفته با وزن متوسط 30 ± 5 گرم، ۱۰ واحد بین المللی هورمون گنادوتروپین

نمونه برداری از موش‌ها در روز ۳۰ بعد از تیمار صورت گرفت. دیابتی کردن موش‌ها با تزریق داخل صفاقی ۴۵ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن استریتوزوتوسین حل شده در بافر سیترات انجام شد. سنجش میزان قند خون برای تشخیص موش‌های دیابتی، ۷۲ ساعت بعد از تزریق استریتوزوتوسین و با استفاده از خون گیری از سیاهرگ دمی، به کمک کیت گلوکومتر انجام شد. حیوانات دارای قند خون بیش از ۳۰۰ میلی گرم در هر دسی لیتر به عنوان موش دیابتی در نظر گرفته شدند.

تهیه عصاره هیدروالکلی بومادران

بعد از تهیه گل‌های این گیاه و تأییدیه آن توسط دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، گل‌های این گیاه خشک و سپس آسیاب شدند. پودر حاصل در داخل بشری حاوی محلول الکل و آب به ترتیب با نسبت ۷۰ به ۳۰ با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد (۱۰ گرم پودر بومادران در ۱۰۰ میلی لیتر محلول الکل و آب) به مدت ۴۰ دقیقه و ۳ مرتبه (بر روی هیتر مغناطیستی) قرار داده شد. بعد از فیلتر کردن، مایع به دست آمده در شرایط خلأ با دمای ۵۶ درجه سانتی گراد تغلیظ شد تا به ۱/۱۲ حجم اولیه برسد. عصاره به دست آمده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری و در مواقع مصرف با آب مقطر رقیق شد و مورد استفاده قرار گرفت [۱۰].

روش اخذ اسپرم

ابتدا موش‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی با استفاده از کتامین و زایلازین بیهوش و سپس به روش جابه جایی مهره‌های گردنی آسان کشی شدند. بعد از بازگشایی محوطه شکمی، دم اپیدیدیم برداشته و در داخل یک میلی لیتر محیط کشت HTF حاوی ۴ میلی گرم آلبومین سرم گاوی^۵ به داخل انکوباتور CO₂ ۵ درصد با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه منتقل شد تا اسپرم‌های موجود در دم اپیدیدیم وارد محیط کشت شوند. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه دم اپیدیدیم را از محیط کشت خارج شد و از اسپرم‌های موجود در محیط کشت برای ارزیابی پارامترهای اسپرمی استفاده شد. سپس محیط کشت حاوی اسپرم به مدت ۶۰ دقیقه در داخل انکوباتور CO₂ جهت ظرفیت یابی اسپرم‌ها و اضافه کردن اسپرم به قطره لقاح حاوی اوسیت‌های اخذ شده قرار داده شد.

ارزیابی تعداد کل اسپرم‌ها

جهت ارزیابی تعداد کل اسپرم‌ها، ابتدا رقت ۱ به ۲۰ از اسپرم‌های به دست آمده از دم اپیدیدیم (۵ میکرو لیتر اسپرم موجود در محیط کشت با ۹۵ میکرو لیتر رقیق کننده) تهیه شد. سپس ۱۰ میکرو لیتر از رقت تهیه شده که کاملاً مخلوط شده بود،

5. Bovine Serum Albumin

یافته‌ها

ارزیابی تعداد اسپرم

مشخص شد در گروه دیابتی، تعداد اسپرم کاهش معناداری در مقایسه با گروه کنترل داشت. در گروه‌های دیابتی-بومادران در هر ۳ دُز پایین، متوسط و بالا، افزایش در تعداد اسپرم‌ها در مقایسه با گروه دیابتی قابل مشاهده است که این افزایش در تعداد اسپرم‌ها فقط در گروه دُز متوسط و بالا اختلاف معناداری ($P < 0/05$) را در مقایسه با گروه دیابتی نشان داد. اختلاف معناداری مابین گروه‌های دیابتی-بومادران وجود نداشت ($P \geq 0/05$). میانگین تعداد اسپرم‌ها در گروه‌های مختلف در تصویر شماره ۱ آمده است.

ارزیابی درصد اسپرم‌های زنده

نتایج حاصله در تصویر شماره ۱ نشان می‌دهد درصد اسپرم‌های زنده در گروه دیابتی کاهش یافته است و این کاهش در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معناداری را نشان می‌دهد ($P < 0/05$). در گروه‌های دیابتی-بومادران فقط در دُز بالا افزایش در درصد اسپرم‌های زنده اختلاف معناداری را در مقایسه با گروه دیابتی نشان می‌دهد ($P < 0/05$) (تصویر شماره ۲).

درصد اسپرم‌های نابالغ

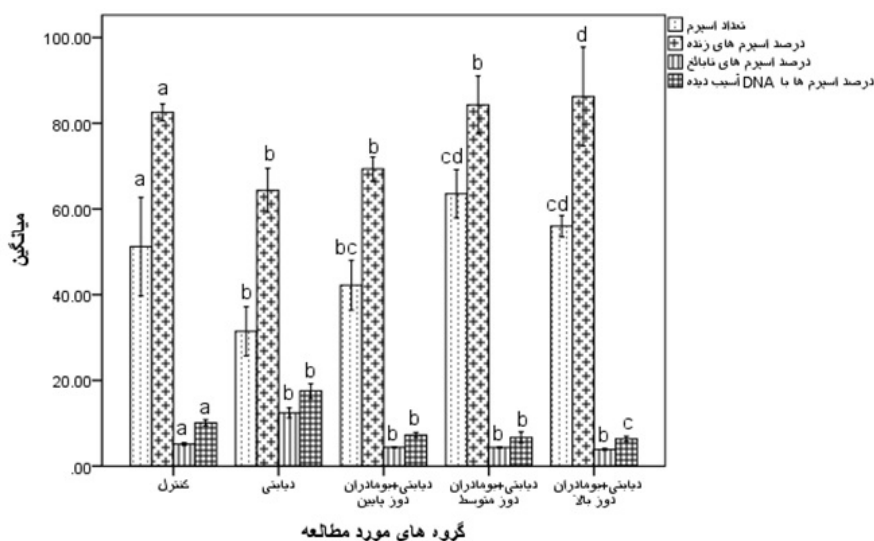
در رنگ‌آمیزی آنیلین بلو مشخص شد درصد اسپرم‌های نابالغ در گروه دیابتی افزایش معناداری در مقایسه با گروه کنترل دارد ($P < 0/05$). در هر ۳ گروه دیابتی-بومادران کاهش در درصد

سرم مادبان آبهستن^۶ به صورت داخل صفاقی و بعد از گذشت ۴۸ ساعت از تزریق هورمون PMSG، هورمون گنادوتروپین کوریون انسان^۷ به میزان ۱۰ واحد بین‌المللی به صورت داخل صفاقی تزریق شد. ۱۲ ساعت بعد از تزریق HCG، تخمک‌گیری از موش‌های سوری به روش دیسکت کردن (با استفاده از یک سرنگ انسولینی با سر سوزن گیج ۲۷ ناحیه آمپول را پاره کرده تا اووسیت‌ها وارد محیط کشت شوند) از ناحیه آمپول اویداکت صورت گرفت. تخمک‌های به دست آمده در داخل یک قطره لقاح ۵۰۰ میکرولیتری از محیط کشت HTF قرار داده شدند. در ادامه ۱ میلیون اسپرم که قبلاً به توانایی رسیده‌اند به ازای هر میلی‌لیتر از محیط کشت (قطره لقاح) برای باروری اووسیت‌ها به قطره لقاح اضافه شد. بعد از ۶ ساعت و با مشاهده ۲ پیش‌هسته، درصد لقاح محاسبه شد. همچنین درصد تشکیل جنین‌های دو سلولی بعد از گذشت ۲۴ ساعت و بلاستوسیسست‌ها در روز ۴ الی ۵ بعد از لقاح مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۳].

تحلیل آماری

داده‌های حاصله با نسخه ۲۱ نرم‌افزار SPSS و آزمون آنوای یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شدند. مقادیر در سطح ($0/05 < SE \pm M$) از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شدند.

6. Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG)
7. Human Chorionic Gonadotropin (HCG)



تصویر ۱. میانگین تعداد کل اسپرم در هر میلی‌لیتر محیط کشت ($10^6 \times$)، درصد اسپرم‌های زنده، درصد اسپرم‌های نابالغ و درصد اسپرم‌ها با DNA آسیب‌دیده در گروه‌های مختلف مورد مطالعه ($M \pm SD$). حروف لاتین abcd متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنادار در هر پارامتر مابین گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد ($M \pm SE$).

جدول ۱. میانگین درصد لقاح، درصد جنین‌های دو سلولی، درصد بلاستوسیست‌ها، درصد جنین‌های هچ‌شده و درصد جنین‌های متوقف‌شده در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

میانگین $\pm$ انحراف معیار					گروه
دیابتی + بومادران دُز بالا (۵۰ میلی گرم/کیلوگرم/روز)	دیابتی + بومادران دُز متوسط (۷۵ میلی گرم/کیلوگرم/روز)	دیابتی + بومادران دُز پایین (۳۷/۵ میلی گرم/کیلوگرم/روز)	دیابتی	کنترل	
۸۷/۱۸ $\pm$ ۴/۲۲ ^c	۷۷/۲۵ $\pm$ ۵/۲۷ ^b	۷۲/۵۱ $\pm$ ۳/۹ ^b	۵۳/۳۴ $\pm$ ۲/۳۴ ^b	۷۵/۵۱ $\pm$ ۱۶/۴ ^a	درصد لقاح
۸۱/۲۷ $\pm$ ۰/۴ ^c	۷۵/۹۴ $\pm$ ۷/۶۴ ^b	۷۶/۶۵ $\pm$ ۴/۹۲ ^b	۶۱/۷۱ $\pm$ ۳/۶۲ ^b	۸۹/۰۲ $\pm$ ۴/۶ ^a	درصد جنین‌های دو سلولی
۷۳/۴۴ $\pm$ ۵/۵۵ ^c	۶۵/۰۴ $\pm$ ۴/۱۲ ^b	۶۳/۶۱ $\pm$ ۴/۵۵ ^b	۴۰/۳۷ $\pm$ ۱/۵۸ ^b	۶۱/۱۹ $\pm$ ۲/۶۳ ^a	درصد بلاستوسیست‌ها
۶۱/۰۹ $\pm$ ۴/۵۲ ^c	۵۷/۹۸ $\pm$ ۵/۳۵ ^b	۵۸/۷۷ $\pm$ ۷/۹۰ ^b	۳۴/۷۳ $\pm$ ۲/۶۶ ^b	۵۴/۴۸ $\pm$ ۴/۷۸ ^a	درصد جنین‌های هچ شده
۳۲/۶۲ $\pm$ ۶/۰۲ ^b	۳۲/۸۷ $\pm$ ۴/۷۳ ^b	۳۴/۴۲ $\pm$ ۵/۰۶ ^b	۵۴/۳۳ $\pm$ ۴/۵۷ ^b	۲۰/۰۵ $\pm$ ۲/۹۸ ^a	درصد جنین‌های متوقف‌شده

حروف لاتین abcd متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنادار مابین گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد (M $\pm$ SE).

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

و اختلاف معناداری را در مقایسه با گروه کنترل دارد ($P < ۰/۰۵$)، اما در گروه‌های دیابتی + بومادران، در هر ۳ دُز کاهش در میزان اسپرم‌های با DNA آسیب‌دیده وجود دارد و این کاهش اختلاف معناداری را در مقایسه با گروه دیابتی نشان می‌دهد (تصویر شماره ۱) ($P < ۰/۰۵$).

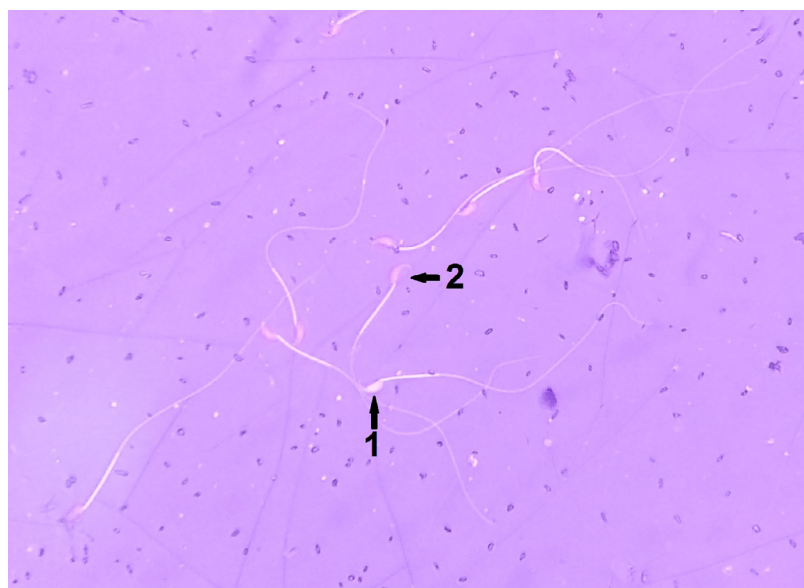
ارزیابی درصد لقاح و رشد جنین‌ها

نتایج این تحقیق (جدول شماره ۱) نشان داد که میزان درصد

اسپرم‌های نابالغ دیده می‌شود، اما هیچ اختلاف معناداری در کاهش درصد اسپرم‌های نابالغ در مقایسه با گروه دیابتی مشاهده نمی‌شود ($P \geq ۰/۰۵$). میانگین درصد اسپرم‌های نابالغ در گروه‌های مختلف در تصویر شماره ۱ آورده شده است (تصویر شماره ۳).

ارزیابی کیفیت DNA اسپرم‌ها

در رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج مشخص شد که در گروه دیابتی، افزایش درصد اسپرم‌ها با DNA آسیب‌دیده وجود دارد



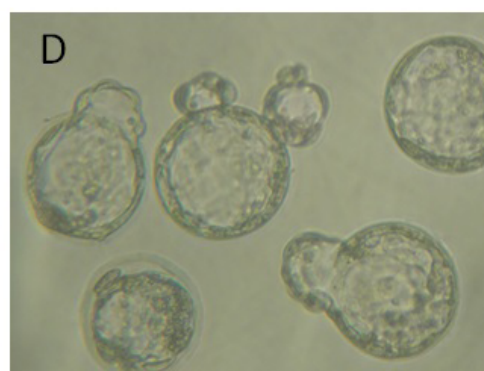
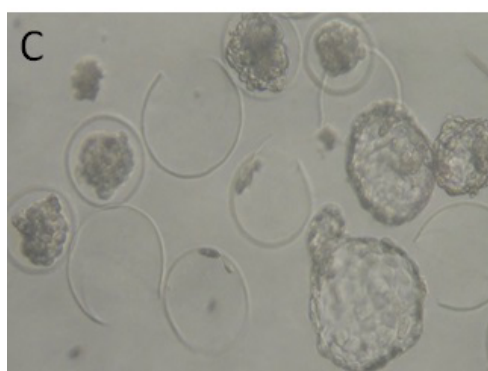
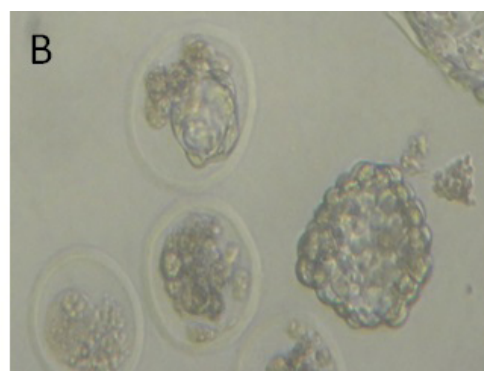
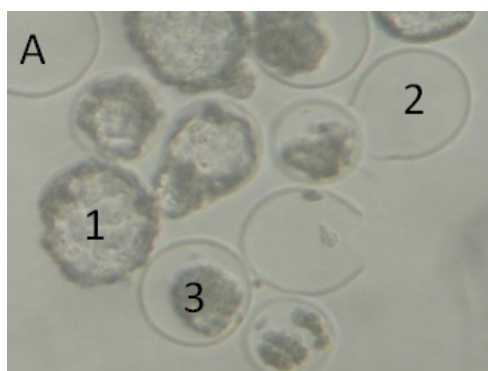
مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۲. در این تصویر یک اسپرم زنده با سر روشن (۱) و چندین اسپرم مرده با سر قرمز رنگ (۲) در گروه دیابتی + بومادران دُز متوسط دیده می‌شود (رنگ‌آمیزی اتوزین-تگروزین، درشت نمایی $\times ۱۰۰$).



مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۳. در این تصویر اسپرم‌های بالغ با سر بی رنگ و روشن (۱) و اسپرم‌های نابالغ با سر آبی رنگ (۲) در گروه دیابتی بومادران دُز بالا دیده می‌شود (رنگ‌آمیزی آنیلین بلو، درشت‌نمایی $\times 400$).



مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۴. در گروه کنترل (A)، جنین‌ها در روز ۵ بعد از لقاح و در مراحل مختلف رشد دیده می‌شوند. جنین‌های هچ‌شده (۱) و پرده شفاف (۲) مربوط به جنین‌های هچ‌شده و تعدادی جنین متوقف‌شده (۳) مشاهده می‌شود؛ اما در گروه دیابت (B)، کیفیت جنین‌ها پایین بوده و تعداد زیادی جنین متوقف‌شده در مراحل مختلف رشد دیده می‌شود. در گروه‌های دیابتی بومادران دُز متوسط (C) و دُز بالا (D)، جنین‌ها کیفیت خوبی داشتند و جنین‌های متوقف‌شده کمتری نیز قابل مشاهده است (میکروسکوپ اینورت، درشت‌نمایی $\times 200$).

لقاح، درصد جنین‌های دوسلولی و بلاستوسیست‌ها و همچنین درصد جنین‌های هچ‌شده در گروه موش‌های دیابتی کاهش یافته است و در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معناداری را نشان می‌دهد ($P < 0.05$). در گروه‌های دیابتی دریافت‌کننده بومادران با وجود افزایش در پارامترهای مذکور در هر ۳ دز فقط در دز بالا اختلاف معناداری در مقایسه با گروه دیابتی مشاهده شد ($P < 0.05$). همچنین هیچ اختلاف معناداری ما بین گروه‌های دیابتی-بومادران مشاهده نشد ($P < 0.05$) (تصویر شماره ۴).

ارزیابی جنین‌های متوقف‌شده

مشخص گردید درصد جنین‌های متوقف‌شده در گروه دیابتی افزایش معناداری ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه کنترل داشت، اما در گروه‌های دیابتی-بومادران در هر ۳ دز کاهش در درصد جنین‌های متوقف‌شده وجود داشت، اما هیچ اختلاف معناداری ($P \geq 0.05$) در مقایسه با گروه دیابتی نداشت (جدول شماره ۱).

بحث

تحقیقات نشان داد که ۱۳/۲-۱۷/۳ درصد زوج‌ها در طول زندگی خود دچار ناباروری هستند. در این میان ۵۰ درصد عوامل ناباروری در ارتباط با مردان می‌باشد. عوامل مختلفی در نابارور مردان دخیل است که بیشترین عامل مربوط به کیفیت اسپرم‌ها می‌باشد [۱۴]. دیابت نیز به‌عنوان یکی از مهم‌ترین علل ناباروری در زوج‌های جوان می‌باشد که می‌تواند عوارض سوء خود را با ایجاد اختلالات تولیدمثلی در روند اسپرماتوژنز و فولیکولوژن اعمال کند. پژوهش‌ها شیوع بیماری دیابت در افراد در سنین باروری در ایران را ۷/۷ درصد تخمین زده‌اند که حدوداً ۲/۵ میلیون نفر را شامل می‌باشد. با توجه به اهمیت بیضه‌ها در تولید اسپرم و تخمدان در ایجاد تخمک و اینکه ساختمان این اندام‌ها تحت تأثیر دیابت قرار می‌گیرند. در نتیجه بیماری دیابت در نهایت می‌تواند موجب اختلال در باروری فرد شود.

دیابت می‌تواند با کاهش و یا متوقف کردن ترشح گنادوتروپین‌ها موجب ایجاد اختلال در تولید اسپرم و یا تخمک شود. در نتیجه باعث مهار تولیدمثل شود. هورمون‌های LH و FSH و همچنین هورمون تستوسترون نقش فیزیولوژیک مهمی را در حفظ روند تخمک‌گذاری و تولید اسپرم برعهده دارند. افزایش سیستم استرس اکسیداتیو و کاهش سطوح آنتی‌اکسیدان‌ها یکی دیگر از علل مهم مشکلات افراد مبتلا به بیماری دیابت است [۱۵]. استرس اکسیداتیو، زمانی حاصل می‌شود که تعادل بین تشکیل محصولات مضر و سمی اکسیداسیون رادیکال‌های آزاد و واکنش‌های احیاکننده به هم خورده باشد [۱۶]. استرس اکسیداتیو با تولید و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن، به‌عنوان یکی از علل اساسی پیشرفت مقاومت انسولین و ایجاد دیابت نوع ۲ شناخته شده است [۱۷]. آنتی‌اکسیدان‌ها با ویژگی‌های شیمیایی مختلف

خود قادر هستند یکدیگر را در ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی تقویت و دفاع آنتی‌اکسیدانی درون سلولی را از طریق القای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ارتقا بخشند [۱۸]. رادیکال‌های آزاد تولیدشده در اثر دیابت یکی از دلایل مهم پایین‌بودن تعداد اسپرم‌ها و افزایش درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و در نتیجه کاهش درصد لقاح و تولید جنین در شرایط آزمایشگاهی هستند. رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توانند در توقف تقسیم میوزی تخمک و توقف جنینی و مرگ سلولی دخالت داشته باشند [۱۹]. در یک مطالعه مشخص شد که افزایش پراکسیداسیون لیپیدها می‌تواند منجر به توقف رشد جنین‌های دوسلولی در موش شود [۲۰].

مطالعات فراوانی بر نقش غالب استرس اکسیداتیو در ناباروری تأکید دارد که براساس نتایج حاصله در تحقیق حاضر، در گروه دیابتی تعداد اسپرم و درصد اسپرم‌های زنده کاهش یافته؛ در حالی که درصد اسپرم‌های نابالغ و اسپرم‌ها با DNA آسیب‌دیده افزایش یافته است. همچنین در موش‌های دیابتی درصد لقاح و درصد جنین‌های دوسلولی، بلاستوسیست و جنین‌های هچ‌شده کاهش یافته است. همچنین در گروه دیابتی درصد جنین‌های متوقف‌شده افزایش یافته است. از آنجایی که استرس اکسیداتیو به شدت با دیابت و عوارض آن در ارتباط است. بنابراین آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند نقش مهمی در محافظت بدن در برابر بیماری دیابت ایفا کنند [۲۱]. مطالعات قبلی انجام‌شده نشان می‌دهند که آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند پارامترهای کیفی و کمی اسپرم‌ها و تخمک‌ها را بهبود بخشند. در حالت طبیعی، اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد به‌وسیله سیستم آنتی‌اکسیدانی درون سلولی مانند گلوکاتایون، اسید آسکوربیک و آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز کنترل و مهار می‌شود [۲۲].

بررسی‌های قبلی، نقش آنتی‌اکسیدان‌ها را در کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن^۸ و بهبود توانایی تکامل جنین را مورد تأیید قرار داده‌اند [۲۳، ۲۴]. همچنین برخی تحقیقات نشان داده‌اند که غذاهای با خاصیت آنتی‌اکسیدانی، موجب بالا بردن کیفیت لقاح و افزایش بلوغ داخل آزمایشگاهی اووسیت می‌شوند [۲۵]. تحقیقات قبلی صورت گرفته بر روی تأثیر عصاره بومادران نشان می‌دهد که این گیاه حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدان، ضدالتهاب و ضد درد می‌باشد. همچنین مشخص شد که گیاه بومادران به‌عنوان منبع غنی تانن‌ها در بیماری‌های قلبی و همچنین در بیماری‌های مربوط به سیستم عصبی به‌عنوان درمان مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۶، ۲۷]. همچنین اثرات محافظتی بومادران بر روی زخم‌های معده ناشی از رادیکال‌های آزاد به‌علت دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، مورد تأیید قرار گرفته است [۲۸]. مطالعات نشان داده است که بومادران به‌علت دارا بودن ترکیبات فلاونوئیدی، باعث کاهش اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد اکسیژن در گلبول‌های قرمز و سفید انسان می‌شود [۲۹]. در یک

مطالعه مشخص شد که عصاره آبی بومادران در رت‌ها در دُز بالا می‌تواند اثرات سویی بر روی روند اسپرماتوژنز بگذارد و باعث افزایش تولید اسپرم‌های غیرطبیعی شود. بنابراین در مطالعه حاضر از حداقل دُز مورد استفاده در رفرانس‌ها استفاده شده است [۳۰].

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر مشخص شد که عصاره بومادران باعث افزایش تعداد اسپرم، کاهش درصد اسپرم‌های نابالغ و اسپرم‌ها با کروماتین آسیب‌دیده می‌شود. همچنین عصاره بومادران بر روی روند رشد جنین‌ها اثر مثبت دارد و باعث افزایش درصد لقاح، جنین‌های دو سلولی و جنین‌های مرحله بلاستوسیست شده است. در این تحقیق معلوم شد که عصاره بومادران دارای اثر محافظتی بر روی پارامترهای اسپرم‌ها و جنین‌ها می‌باشد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

کد اخلاق این پژوهش در مورخ ۱۴۰۰/۰۹/۲۴ طی نامه شماره 6821/3/AP توسط معاونت پژوهشی **دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه** صادر شده است.

حامی مالی

معاونت پژوهشی **دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه**، حامی مالی این پژوهش بوده است.

مشارکت‌نویسندگان

تمام نویسندگان در آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشتند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر علی کریمی تشکر می‌شود.

References

- [1] Abu-Bakar U, Subramaniam P, Kamar Bashah NA, Kamalrudin A, Kamaruzaman KA, Jasamai M, et al. Sperm proteomics analysis of diabetic induced male rats as influenced by *Ficus carica* leaf extract. *Processes*. 2020; 8(4):395. [DOI:10.3390/pr8040395]
- [2] Rodgers RJ, Avery JC, Moore VM, Davies MJ, Azziz R, Stener-Victorin E, et al. Complex diseases and co-morbidities: Polycystic ovary syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Endocr Connect*. 2019; 8(3):71-5. [PMID] [PMCID]
- [3] Faghihi G, Radan M. Side effects of herbal drugs used in dermatologic disorders. *J Cosmet Dermatol Sci Applications*. 2011; 1(1):1-3. [DOI:10.4236/jcdsa.2011.11001]
- [4] Asghari B, Mafakheri S, Zengin G, Dinparast L, Bahadori MB. In-depth study of phytochemical composition, antioxidant activity, enzyme inhibitory and antiproliferative properties of *Achillea filipendulina*: A good candidate for designing biologically-active food products. *Food Measure*. 2020; 14(4):2196-208. [Link]
- [5] Benedek B, Kopp B, Melzig MF. *Achillea millefolium* L. s.l. -- is the anti-inflammatory activity mediated by protease inhibition? *J Ethnopharmacol*. 2007; 113(2):312-7. [PMID]
- [6] Petlevski R, Hadzija M, Slijepcevic M, Juretic D. Effect of anti diabetes herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. *J Ethnopharmacol*. 2001; 75(2-3):181-4. [PMID]
- [7] Hasanzadeh Khosh A, Hasanzadeh S, Shalazar Jalali A. Ameliorative effects of *Achillea millefolium* inflorescences alcoholic extract on nicotine-induced reproductive toxicity in male rat: Apoptotic and biochemical evidences. *Vet Res Forum*. 2017; 8(2):97-104. [PMID]
- [8] Jalali Nadoushan MR, Ghosian Moghaddam MH, Chegini V, Jafari H, Zaeri F. [Evaluation of antispermato-genic effects of yarrow in mice (Persian)]. *Tabib-e- Shargh*. 2008; 10(3):219-25. [Link]
- [9] Montanari T, de Carvalho JE, Dolder H. Antispermato-genic effect of *Achillea millefolium* L. in mice. *Contraception*. 1998; 58(5):309-13. [PMID]
- [10] 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. [PMID]
- [11] 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):219-25. [PMID] [PMCID]
- [12] Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J, Zalkalns J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *J Androl*. 2001; 22(1):45-53. [PMID]
- [13] Weisbroth SH. *The laboratory rat*. New York: Elsevier; 2013. [Link]
- [14] Jafari H, Mirzaiinajmabadi K, Roudsari RL, Rakhshkhorshid M. The factors affecting male infertility: A systematic review. *Int J Reprod Biomed*. 2021; 19(8):681-8. [PMID] [PMCID]
- [15] Rezaei N, Mardanshahi T, Shafaroudi MM, Abedian S, Mohammadi H, Zare Z. Effects of L-carnitine on the follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, testosterone, and testicular tissue oxidative stress levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Evid Based Integr Med*. 2018; 23:2515690X18796053. [PMID] [PMCID]
- [16] Kofuji K, Aoki A, Tsubaki K, Konishi M, Isobe T, Murata Y. Antioxidant activity of β -Glucan. *ISRN Pharm*. 2012; 2012:125864. [DOI:10.5402/2012/125864] [PMID] [PMCID]
- [17] Lombardo YB, Chicco AG. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. *J Nutr Biochem*. 2006; 17(1):1-13. [PMID]
- [18] Mahdavi R, Nemati A, Feizi E, Amani M, Alimohammadi Asl H, Mazani M, et al. [Effect of ω 3 fatty acid supplementation on oxidative stress in gastric cancer patients undergoing chemotherapy (Persian)]. *J Ardabil Univ Med Sci*. 2011; 11(2):166-75. [DOI:10.3923/javaa.2012.1858.1863]
- [19] McLean MP, Warden KJ, Sandhoff TW, Irby RB, Hales DB. Altered ovarian sterol carrier protein expression in the pregnant streptozotocin-treated diabetic rat. *Biol Reprod*. 1996; 55(1):38-46. [PMID]
- [20] Nasr-Esfahani M, Johnson MH, Aitken RJ. The effect of iron and iron chelators on the in-vitro block to development of the mouse preimplantation embryo: BAT6 a new medium for improved culture of mouse embryos in vitro. *Hum Reprod*. 1990; 5(8):997-1003. [PMID]
- [21] Zhang P, Li T, Wu X, Nice EC, Huang C, Zhang Y. Oxidative stress and diabetes: Antioxidative strategies. *Front Med*. 2020; 14(5):583-600. [PMID]
- [22] Traish AM, Cushman T, Hoyt R, Kim N. Diabetes attenuates female genital sexual arousal response via disruption of estrogen action. *Korean J Urol*. 2009; 50(3):211-23. [DOI:10.4111/kju.2009.50.3.211]
- [23] Venkateswaran S, Pari L. Effect of *Coccinia indica* leaves on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2003; 84(2-3):163-8. [PMID]
- [24] Takahashi M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *J Reprod Dev*. 2012; 58(1):1-9. [DOI:10.1262/jrd.11-138n] [PMID]
- [25] Vujkovic M, de Vries JH, Dohle GR, Bonsel GJ, Lindemans J, Macklon NS, et al. Associations between dietary patterns and semen quality in men undergoing IVF/ICSI treatment. *Hum Reprod*. 2009; 24(6):1304-12. [DOI:10.1093/humrep/dep024] [PMID]
- [26] Villalva M, Jaime L, Villanueva-Bermejo D, Lara B, Fornari T, Reglero G, et al. Supercritical anti-solvent fractionation for improving antioxidant and anti-inflammatory activities of an *Achillea millefolium* L. extract. *Food Res Int*. 2019; 115:128-34. [PMID]
- [27] Karabay-Yavasoglu NU, Karamenderes C, Baykan S, Apaydin S. Antinociceptive and anti-inflammatory activities and acute toxicity of *achillea nobilis*. subsp. *neilreichii*. Extract in mice and rats. *Pharm Biol*. 2007; 45(2):162-8. [DOI:10.1080/13880200601113149]

- [28] Potrich FB, Allemand A, da Silva LM, Dos Santos AC, Baggio CH, Freitas CS, et al. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.:Involvement of the antioxidant system. *J Ethnopharmacol.* 2010; 130 (1):85-92. [\[PMID\]](#)
- [29] Konyalioglu S, Karamenderes C. The protective effects of *Achillea* L. species native in Turkey against H₂O₂-induced oxidativedamage in human erythrocytes and leucocyte. *J Ethnopharmacol.* 2005; 102(2):221-7. [\[PMID\]](#)
- [30] Dalsenter PR, Cavalcanti AM, Andrade AJ, Araújo SL, Marques MC. Reproductive evaluation of aqueous crude extract of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in Wistar rats. *Reprod Toxicol.* 2004; 18(6):819-23. [\[PMID\]](#)

This Page Intentionally Left Blank