تأثیر حمایتی عصاره هیدروالکلی خارخاسک بر میزان سمیت سلولی سیس‌پلاتین بر قدرت زنده مانی و تعداد اسپرم در موش سوری

زهرا کشتمند[1*]، شهربانو عریان[2]، علی قنبری[3]، مظفر خزاعی[3]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۲- استاد، گروه زیست، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۳- استاد، مرکز تحقیقات باروری و ناباروری، دانشکده علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
*آدرس مکاتبه: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست، تهران، ایران
تلفن: ۰۹۱۸۷۳۴۰۵۱۵
پست الکترونیک: zkeshtmand2001@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۲۷ **تاریخ تصویب:** ۹۳/۴/۱۴

چکیده

مقدمه: سیس پلاتین، داروی ضد سرطان است که در شیمی درمانی استفاده می‌شود، اثرات جانبی این دارو شامل بی‌اشتهایی، تهوع، کاهش عملکرد غدد جنسی آزواسپرمی و الیگواسپرمی است. خارخاسک دارای ترکیبات زیادی است که عمده این ترکیبات موجب خواص آنتی‌اکسیدانی و حفاظتی آن می‌شود.

هدف: بررسی تأثیر حمایتی عصاره هیدروالکلی خارخاسک بر میزان سمیت سلولی سیس‌پلاتین بر قدرت زنده مانی و تعداد اسپرم در موش سوری می‌باشد.

روش بررسی: به ۳۰ موش سوری به مدت ٤ روز داروی سیس‌پلاتین به همراه عصاره خارخاسک داده شد، پس از ٤ روز حیوانات وزن شده و پس از بیهوشی، اپیدیدیم را بیرون آورده، تعداد اسپرم و قدرت زنده مانی اسپرم بررسی شد. برای آنالیز داده‌ها از تست آماری T-test استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد که سیس‌پلاتین به تنهایی موجب کاهش وزن بدن، کاهش وزن اپیدیدیم، کاهش تعداد اسپرم و قدرت زنده مانی اسپرم نسبت به گروه کنترل شده که در $p<۰/۰۵$ معنی‌دار بوده و در گروه‌هایی که سیس‌پلاتین به همراه عصاره خارخاسک داده شد، وزن بدن، وزن اپیدیدیم، تعداد اسپرم و قدرت زنده مانی اسپرم نسبت به گروه سیس‌پلاتین افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد ترکیبات موجود در عصاره خارخاسک موجب مهار تولید متابولیت‌های فعال حاصل از داروی سیس‌پلاتین و اثرات مخرب این متابولیت‌ها می‌شود. احتمالاً تجویز عصاره خارخاسک به همراه سیس‌پلاتین به دلیل اثرات آنتی‌اکسیدانی خارخاسک و همچنین تأثیر آن بر حذف متابولیت‌های مخرب سیس‌پلاتین در بدن می‌تواند مفید و مؤثر باشد.

گل‌واژگان: خارخاسک، تعداد اسپرم، سیس پلاتین، قدرت زنده‌مانی

مقدمه

سیس‌پلاتین (*cis*- [Pt(II)(NH(3))(2)Cl(2)] ([PtCl2(NH3)2] or CDDP)، یک داروی ضدسرطانی است که به طور گسترده برای درمان سرطان‌های مختلف استفاده می‌شود [۱]. در سال ۱۹۶۹ با آزمایش روی مدل حیوانی پی بردند که دارای خاصیت ضدتومور می‌باشد. داروی ضدسرطان سیس‌پلاتین علاوه بر از بین بردن سلول‌های سرطانی، در بافت‌های سالم نیز اثرات تخریبی اعمال می‌کند. القاء مرگ سلولی، یکی از مکانیسم اصلی عملکرد داروی سیس‌پلاتین است [۳، ۲]. مصرف سیس‌پلاتین در مدل‌های حیوانی منجر به ایجاد اسپرم‌های غیرطبیعی، کاهش تحرک و تعداد اسپرم شده است [۵، ٤]. اثرات سمیت سلولی ناشی از بازجذب سیس‌پلاتین به علت افزایش گونه‌های رادیکال اکسیژن صورت می‌گیرد که منجر به فعال شدن مسیرهای آپوپتوزی داخلی، خارجی، تخریب DNA و پراکسیده شدن لیپیدها می‌شود [۷، ٦]. اسپرم یکی از سلول‌هایی است که در اثر استفاده از سیس‌پلاتین دچار تغییر شکل شده و منجر به ایجاد شکل‌های غیرطبیعی، القا مرگ سلولی و کاهش حرکت رو به جلو در اسپرم می‌شود [۹، ۸]. گیاه خارخاسک با نام علمی *Tribulus terrestris* مشهور به پانکچیر وین، یک گیاه یک‌ساله، خوابیده و بومی است که در نواحی مدیترانه، نواحی گرم اروپا، آسیا، آمریکا، آفریقا و استرالیا به طور گسترده پراکنده شده است [۱۰]. این گیاه در طب سنتی چین، هند، عراق، بلغارستان، جنوب افریقا و همچنین ایران کاربرد دارد. مطالعات نشان داده است گیاه خارخاسک محتوای استروئیدها، ساپونین، فلاونوئیدها، الکانوییدها، اسیدهای چرب غیراشباع، ویتامین‌ها، تانن‌ها، رزین‌ها، پتاسیم، نیترات، آسپارتیک‌اسید و گلوتامیک اسید است [۱۱]. این گیاه دارای فواید مختلفی از جمله خاصیت ضدمیکروبی، ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدسمی است [۱۵، ١٤، ۱۳، ۱۲]. محققان نشان داده‌اند که دیوسین موجود در خارخاسک از طریق افزایش سطوح تستوسترون آزاد و تنظیم استروژن، پروژسترون و پرگننولون، باعث افزایش توانایی جنسی در مردان می‌شود [١٦]. این گیاه به دلیل دارا بودن پروتودیوسین‌ها و ساپونین‌ها که موجب افزایش سطوح تستوسترون و هورمون لوتئنی می‌شود از دیرباز در طب سنتی چین و هند در درمان ناتوانایی جنسی و افزایش میل جنسی کاربرد داشته است [۱۸، ۱۷]. مصرف خارخاسک همراه با سایر گیاهان دارویی باعث بهبود نعوظ و رفتار جنسی در رت‌ها شده است [۱۹]. نشان داده شده است، مصرف خارخاسک در رت، خرگوش و پریمات باعث افزایش هورمون‌های جنسی می‌شود [۲۰]. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر حمایتی خارخاسک بر میزان اثرات سمیت سلولی سیس‌پلاتین بر تعداد و قدرت زنده‌مانی اسپرم در موش می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد آزمایش در این تحقیق ۳۰ سر موش بالغ نژاد BALB/c با وزن متوسط ۳۰ – ۲۵ گرم بود. موش‌ها به ۵ گروه ٦ تایی تقسیم و در تمام مدت ٤ روز آزمایش، حیوانات طی دوره ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفتند. آب آشامیدنی حیوانات در تمام طول آزمایش آب لوله‌کشی شهری و تغذیه به صورت غذای مخصوص موش بود. درجه حرارت در طول آزمایش ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تابش نور به صورت غیرمستقیم و از طریق پنجره‌های آزمایشگاه صورت می‌گرفت.

دارو

داروی سیس‌پلاتین در شرایط تاریکی ۲۰ – ۱۵ دقیقه قبل از تزریق در نرمال سالین حل شده و به صورت تک دوز (۵/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تزریق شد [۲۱].

تهیه عصاره

پس از تأیید گیاه توسط گروه زیست‌شناسی دانشکده رازی کرمانشاه، گیاه خشک شده خارخاسک آسیاب و به روش پرکولاسیون عصاره‌گیری شد. طبق این روش ٤۰۰ گرم گیاه آسیاب شده را با ۸۰۰ سی سی الکل اتانول ۷۰ درصد در پرکولاتور خیس نموده و ۷۲ ساعت آن را کنار گذاشته و سپس

عصاره به صورت قطره قطره از پرکولاتور خارج و جمع‌آوری شد. حلال بوسیله خلاء تبخیر و عصاره در سطح صاف تمیز، خشک و تهیه شد [۲۲].

گروه کنترل موش‌هایی که نرمال سالین را دریافت کردند. گروه تجربی ۱ موش‌های که سیس‌پلاتین ۵/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تک دوز به آنها تزریق شد.

گروه تجربی ۲ موش‌هایی که سیس‌پلاتین تک دوز را همراه با عصاره هیدروالکلی خارخاسک با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند.

گروه تجربی ۳ موش‌هایی که سیس‌پلاتین تک دوز همراه با عصاره هیدروالکلی خارخاسک با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به آنها دریافت کردند.

گروه تجربی ٤ موش‌هایی که سیس‌پلاتین تک دوز را همراه با عصاره هیدروالکلی خارخاسک با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به آنها تزریق شد.

مدت زمان دریافت عصاره در گروه‌های تجربی ۲، ۳ و ٤، ٤ روز و دریافت دارو به صورت تزریق داخل صفاقی می‌باشد. یک روز پس از آخرین تزریق، موش‌ها درون دسیکاتور حاوی پنبه آغشته به اتر قرار گرفته و بیهوش شدند. جهت بررسی تعداد و قدرت زنده‌مانی اسپرم، اپیدیدیم چپ حیوانات به دقت از بدن خارج شد. بافت اپیدیدیم در یک پتری دیش حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت DMEM محتوای FBS ۵ درصد خرد و پس از به هم زدن آن، نمونه به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. به منظور بررسی قدرت زنده‌مانی اسپرم‌ها از رنگ‌آمیزی ائوزین Y استفاده کرده، بدین‌منظور با سمپلر ۱۰ میکرولیتر، حجمی از محیط کشت محتوای اسپرم‌های آزاد شده را برداشته داخل میکروتیوب ریخته و به اندازه حجم برداشته شده از محیط کشت، رنگ ائوزین اضافه کرده یک قطره از نمونه را بر روی لام قرار داده و زیر میکروسکوپ نوری اسپرم‌های زنده و مرده را مورد شمارش قرار داده از هر لام ۱۰۰ اسپرم را از لحاظ قدرت زنده‌مانی با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار داده شد. اسپرم‌های زنده در زیر میکروسکوپ نوری رنگ روشن (بی‌رنگ) و اسپرم‌های مرده (قرمز) دیده می‌شوند.

برای شمارش تعداد اسپرم‌ها نیز با کمک سمپلر ۱۰ میکرولیتر، حجمی از محیط کشت محتوای اسپرم‌های آزاد شده را داخل میکروتیوب ریخته و به اندازه حجم برداشته شده از محیط کشت، فرمالین جهت جلوگیری از تحرک اسپرم‌ها هنگام شمارش استفاده کرده از حجم تهیه شده، یک قطره از نمونه را بر روی لام نئوبار قرار داده، اسپرم‌های مشاهده شده در مربع‌های مربوط به شمارش گلبول سفید در زیر میکروسکوپ نوری را شمارش نموده، برای به دست آوردن تعداد اسپرم‌ها از فرمول زیر استفاده شد.

$$\text{تعداد اسپرم} = \frac{\text{اسپرم‌های شمارش شده در ٤ مربع} \times \text{فاکتور رقت} \times ۱۰^{٦}}{٤}$$

آمار

جهت بررسی و مقایسه نتایج حاصل از تعداد و قدرت زنده‌مانی اسپرم‌ها بین گروه‌های از نرم‌افزار SPSS، روش آماری واریانس یک طرفه استفاده شد. نتایج $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

در گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳ و ٤ وزن بدن، نسبت به گروه کنترل کاهش یافته که این کاهش در گروه‌های تجربی ۱ معنی‌دار است ($p<۰/۰۵۰$)، در گروه‌های تجربی ۲، ۳ و ٤ با افزایش میزان دوز عصاره خارخاسک، وزن بدن نسبت به گروه تجربی ۱ افزایش یافته است (نمودار شماره ۱ الف).

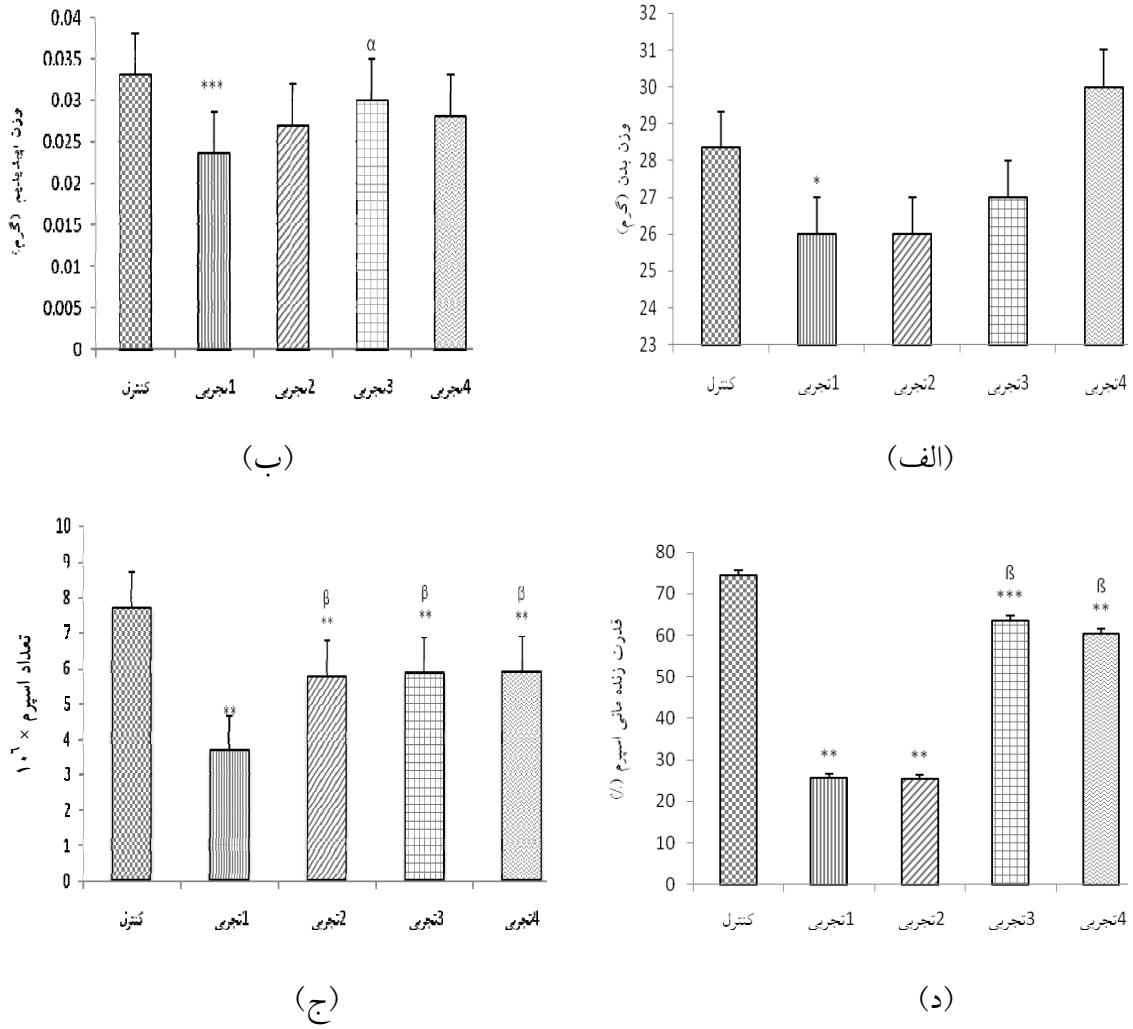
در گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳ و ٤ وزن اپیدیدیم نسبت به گروه کنترل کاهش یافته که در گروه‌های تجربی ۱ این کاهش معنی‌دار می‌باشد ($p< ۰/۰۱$).

در گروه‌های تجربی ۲، ۳ و ٤ با افزایش میزان دوز عصاره خارخاسک وزن اپیدیدیم نسبت به گروه تجربی ۱ افزایش یافته، البته در گروه تجربی ۲، ۳ و ٤ افزایش معنی‌داری نسبت به گروه تجربی ۱ نشان داده نشد (نمودار شماره ۱ ب).

از طرف دیگر در گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳ و ٤ تعداد سلول‌های اسپرم نسبت به گروه کنترل کاهش یافته و این

کاهش در گروه‌های ۲، ۳ و ٤ در سطح p< ۰/۰۱ معنی‌دار بود. در گروه‌های تجربی ۲، ۳ و ٤ تعداد سلول‌های اسپرم نسبت به گروه تجربی ۱ افزایش یافته البته در گروه‌های تجربی دریافت‌کننده عصاره خارخاسک این افزایش در سطح p< ۰/۰۱ معنی‌دار است (نمودار شماره ۱ ج).

در این مطالعه قدرت زنده‌مانی اسپرم مورد بررسی قرار گرفت که تعداد سلول‌های اسپرم زنده در گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳ و ٤ نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد، اما در گروه‌های تجربی ۳ و ٤ تعداد سلول‌های اسپرم زنده در مقایسه با گروه تجربی ۱ که سیس‌پلاتین را به تنهایی دریافت کردند، افزایش معنی‌داری مشاهده شد (نمودار شماره ۱د) (p<۰/۰۱).



نمودار شماره ۱- تأثیر حمایتی عصاره هیدروالکلی خارخاسک بر سیتوتوکسیستی القا شده دارو سیس پلاتین در گروه‌های تجربی و کنترل. الف: وزن بدن، ب: وزن اپیدیدیم، ج: تعداد اسپرم، د: قدرت زنده‌مانی اسپرم. گروه کنترل نرمال سالین دریافت کرد. گروه تجربی ۱: سیس‌پلاتین (۵/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، گروه تجربی ۲: سیس‌پلاتین + عصاره خارخاسک (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، سیس‌پلاتین + عصاره خارخاسک (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، گروه تجربی٤: سیس‌پلاتین + عصاره خارخاسک (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم). علامت * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار p< ۰/۰۵ با گروه کنترل است. علامت ** نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار p<۰/۰۱ با گروه کنترل است. علامت α نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار p< ۰/۰۵ با گروه تجربی ۱ است. علامت β نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار p< ۰/۰۱ با گروه تجربی ۱ است.

بحث

در مطالعه حاضر، کاهش میانگین وزن بدن، وزن اپیدیدیم، تعداد اسپرم‌ها و قدرت زنده‌مانی اسپرم در گروه تجربی ۱ که سیس‌پلاتین را به صورت تک دوز دریافت کردند نشان داده شد. روش‌های متعددی برای کاهش اثرات جانبی داروهایی که در شیمی درمانی استفاده می‌شود، وجود دارد، هورمون درمانی و استفاده از عصاره گیاهان از جمله این روش‌هاست [۲۷، ۲٦، ۲۵]. مطالعات نشان داده انتقال سیس‌پلاتین به درون سلول باعث ایجاد اسپرم به شکل‌های غیرطبیعی، انباشته شدن رادیکال‌های آزاد، پراکسیده شدن اسیدهای چرب مهم دخالت‌کننده در عملکرد اسپرم، القا استرس اکسیداتیو و شروع آپوپتوزیس می‌شود [۲۸]. در مطالعات دیگر نشان داده شده است که عصاره خارخاسک دارای ترکیبات مختلف از جمله انواع ویتامین‌های A، C، E، اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه ضروری می‌باشد. برای این گیاه اثرات درمانی و خواص متعددی بیان شده است چنانچه از آن به عنوان ضدعفونی‌کننده دستگاه گوارش، گیاه محرک، مدر، اشتهاآور و تقویت‌کننده عملکرد جنسی یاد شده است. مصرف خارخاسک اشتهاآور است، می‌تواند کم اشتهایی حاصل از داروی سیس‌پلاتین را تا حدودی برطرف نماید [۲۹].

ویتامین A یکی از عوامل رشد حیوانات به حساب می‌آید و فقدان این ویتامین در موش موجب توقف رشد حیوان و کاهش وزن می‌شود. ویتامین A می‌تواند با تبدیل به رتینوئید موجب ذخیره چربی به صورت تری‌گلیسرید در بدن شده و موجب افزایش وزن بدن شود [۱۱]. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت ویتامین A موجود در خارخاسک می‌تواند تا حدودی کاهش وزن را در گروه‌های تجربی ۲، ۳ و ٤ نسبت به گروه تجربی ۱ جبران کند.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی خارخاسک به علت ترکیبات متعدد فلاونوئیدها و گلیکوزیدهای موجود در آن می‌باشد که تعداد این ترکیبات در عصاره خارخاسک، فراوان دیده می‌شود. این فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجب از بین رفتن رادیکال‌های آزاد شده و همچنین موجب جلوگیری از متابولیت فعال داروی سیس‌پلاتین و حذف آنها می‌شود [۳۱، ۳۰] بنابراین با حذف متابولیت فعال سیس‌پلاتین از مهار تقسیمات میتوزی و میوزی درون بیضه ممانعت می‌کند و با افزایش میزان دوز عصاره خارخاسک، افزایش وزن اپیدیدیم، تعداد سلول‌ها و قدرت زنده‌مانی اسپرم در گروه‌های تجربی ۲، ۳ و ٤ نسبت به گروه تجربی ۱ مشاهده می‌شود.

تیمار موش‌ها با عصاره خارخاسک جمعیت اسپرم، قابلیت زیست و تعداد اسپرم‌ها را به علت کاهش سطح گونه‌های واکنش دهنده اکسیژن افزایش داده، بنابراین طبق این دلایل می‌توان افزایش تعداد و قدرت زنده‌مانی اسپرم‌ها را در این تحقیق به اثر ترکیبات مؤثر خارخاسک نسبت داد. همچنین مطالعات دیگر نشان داده است، عصاره خارخاسک تأثیر مثبتی بر خصوصیات کیفی، کمی و تحرک اسپرماتوزوئیدها، مقدار کلسترول و افزایش حجم انزال در پرندگان دارد [۳۲]. مطالعات دیگر نشان می‌دهد که گیاه خارخاسک به دلیل دارا بودن ساپونین‌ها باعث افزایش ترشح هورمون لوتئینی از غده هیپوفیز می‌شود. هورمون لوتئینی نیز محرک ویژه برای تولید تستوسترون است، از این رو قادر به بهبود عملکرد جنسی از جمله افزایش تولید اسپرم نرمال، بهبود عملکرد جنسی از جمله افزایش میل جنسی می‌شود [۳۳]. فروستانول یکی از ساپونین‌های خارخاسک است که اثر محرک بر اسپرماتوژنز دارد. این ماده باعث بهبود معنی‌دار کیفیت و کمیت اسپرم می‌شود [۳٤]. در این مطالعه مشاهده شد که در گروه‌های تجربی که عصاره خارخاسک را با دوزهای مختلف دریافت کردند تعداد و قدرت زنده‌مانی اسپرم در مقایسه با گروه تجربی دریافت‌کننده داروی سیس‌پلاتین به صورت تک دوز افزایش یافت.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره خارخاسک اثر حمایتی بر میزان سمیت سلولی القا شده توسط سیس‌پلاتین بر تعداد و قدرت زنده‌مانی اسپرم داشته که احتمالاً به دلیل دارا بودن ترکیبات مؤثر این عصاره، کاهش گونه‌های رادیکال آزاد طریق مکانیسم‌های متعدد ردوکس سیگنالینگ و

احتمالاً مسیرهای دیگر می‌باشد. استفاده از این گیاه سرشار از ترکیبات مفید و مؤثر توسط بیمارانی که به دلایلی به خاطر مصرف داروهای شیمیایی، باروری آنها دچار اختلال شده احتمالاً می‌تواند به نوعی در درمان ناتوانی در باروری مؤثر واقع شود.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات باروری و ناباروری و گروه آناتومی کرمانشاه که در انجام این پروژه ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

1. Ana-Maria F and Dietrich B. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *J. Cancers*. 2011; 3: 1351 - 71.

2. Tsukamoto G, Ichikawa H, Kobashi M, Yamada Y, Kikuchi T, Mese H and Sasaki A. Cisplatin-induced long-term dynorphin A-immuno reactivity in cell somata of rat area postrema neurons. *J. Neurosci Lett.* 2007; 424: 122 - 6.

3. Altena R, Haas EC, Nuver J, Brouwer CA, Van den Berg MP, Smit AJ, Postma A, Sleijfer DT and Gietema JA. Evaluation of sub-acute changes in cardiac function after cisplatin-based combination hemotherapy for testicular cancer. *Br. J. Cancer* 2009; 100: 1861 - 6.

4. Hansen PV, Trykker H, Helkjoer PE and Andersen J. Testicular function in patients with testicular cancer treated with orchiectomy alone or orchiectomy plus cisplatin base chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst*. 1989; 81: 1246 - 54.

5. Oshio S,Tomamasa H, Amemiya T, Yazaki T, Moheri H, Umeda T and Waku M. Damaging effects of cisplatin on mouse spermatozoa, *Arch Androl* 1990; 24: 13 - 20.

6. Pabla N, Huang S, Mi QS, Daniel R and Dong Z. ATR-Chk2 Signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 6572 – 83.

7. Brozovic A, Ambriović-Ristov A and Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit. Rev. Toxicol*. 2010; 40: 347 – 59.

8. Gandini L, Sgrò P, Lombardo F, Paoli D, Culasso F, Toselli L, Tsamatropoulos P and Lenzi A. Effect of chemo- or radiotherapy on sperm parameters of testicular cancer patients. *J. Hum. Repro.* 2006; 21: 2882 – 9.

9. Sawhney P, Giammona CJ, Meistrich ML, Richburg JH. Cisplatin-induced long-term failure of spermatogenesis in adult C57/Bl/6J mice. *J. Androl*. 2005; 26: 136 - 45.

10. Ahmed AH, Abbas AM, Heba. HI and Amir HA. Study the Biological Activities of *Tribulus Terrestris* Extracts. *J. Engin & Techn*. 2005; 11: 433 - 5.

11. Karimi J, Malekzadeh H, Shiravani S and Hoshmand F. The effect of the *Tribulus terrestris* extract on spermatogenesis in the rat. *J. Jahrom Uni. Med. Scien*. 2012; 9: 7 - 11.

12. Firas A, Bayati AL and Hassan F. An tibacterial and antifungal activities of different parts of *Tribulus terrestris* L. growing in Iraq. *Zhejiang Univ Sci*. 2008; 9: 154 - 9.

13. Kianbakbat S and Jahaiani F. Evaluation of antibacterial activity of *Tribulus terrestris* L.growing in Iran. *Iranian J. Pharmacol Ther*. 2003; 2: 22 - 4.

14. Kadry H, Abou BL and Gindi EL. Antioxidant activity of aerial parts of *Tribulus alatus* in rats, *Pak. J. Pharma. Sci*. 2010; 23: 59 - 62.

15. Svetlana G, Borislav K and Veselina S. Effect of *Tribulus terrestris* extract on semen quality and

serum total cholesterol content in White Plymouth Rock-mini cocks.*Bio Biotech Animal Husban*. 2008; 24: 139 - 46.

16. Chemexcil. *Tribulus terrestris* L. (N.O. Zygophyllaceae. Selected medicinal plants of India. A monograph of identity, safety and clinical usage. *Bombay: Tata Press.* 1989; 1992: 323 - 6.

17. Koumanov F, Bozadjieva E and Andreeva M.Clinical trial of Tribestan. *J. Exp. Med*. 1982; 4: 211 - 5.

18. Martino-Andrate AJ,Morasis RN ,Sperocoski KM. Effect of *Tribulus terrestris* on endocrine sensitive organs in male and female wistar rats. *J. Ethnopharmacol*. 2010; 127: 165 - 70.

19. Sang-Won P, Chan –Ho L, Das-Hee S. Effect of SA1, a Herbal formulation, on sexual behavior and penile erection. *Biol. Pharm. Bull*. 2006; 29: 1383 - 6.

20. Gauthaman K and Ganesan AP. The hormonal effects of *Tribulus terrestris* and its role in the management of male erectile dysfunction: an evaluation using primates, rabbit and rat. *Phytomedicine* 2008; 15: 44 – 54.

21. Bagnis C, Beaufils H, Jacquiaud C, Adabra Y, Jouanneau C, Le Nahour G et al. Erythropoietin enhances recovery after cisplatin-induced acute renal failure in the rat. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2001; 16: 932 - 8.

22. Khazaei M and Salehi S. Protective effect of Falcaria vulgaris extract on ethanol- induced gastric ulcers in rat. *Iran J. Pharmacol. Ther.* 2006; 5: 1 - 4.

23. Cao XW, Lin K, Li CY and Yuan CW. A review of WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (5th edition). *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2011; 17: 1059 - 63.

24. Momeni HR, Soleimani Mehranjani M, Abnosi MH and Mahmoodi M. Effects of vitamin E on spermparameters and reproductive hormones in developing rats treated with para-nonylpheno. *Iran J. Repro. Med*. 2009; 7: 111 - 6.

25. Kurdoglu B, Wilson G, Parchuri N, Ye WS and Meistrich ML. Protection from radiation in duced damage to spermatogenesis by hormone treatment, *Radiat Res.*1994; 139: 97 - 102.

26. Pogach LM, Lee Y, Gould S, Giglio W and Huang HF. Partial prevention of procarbazine induced germinal cell aplasia in rats by sequential GnRH antagonist and testosterone administration, *Cancer Res*.1996; 48: 4354 - 63.

27. Kangasniemi M, Wilson G, Huhtaniemi I and Meistrich ML. Protection against procarbazine-induced testicular damage by GnRH-agonist and antiandrogen treatment in the rat, *Endocrinol*. 1995; 136: 3677 - 84.

28. Wozniak K, Czechowska A and Blasiak J. Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and itsmodulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571. *Chemico-Biolo. Inter*. 2004; 24: 309 – 18.

29. Kadry H, Abou BL and Gindi O. Antioxidant activity of aerial parts of Tribulus alatus in rat. *Pak. J. Pharm. Sci*. 2010; 23: 59 - 62.

30. Harborne JB and Williams CA. Advances in flavonoid research since. *Phytochem.* 2005; 55: 481 - 504.

31. Das NP and Pereira TA. Effects of flavonoids onthermal autoxidation of palm oil: structure activity relationships. *J. Ame. Chem. Soc*. 1990; 67: 255 - 8.

32. Grigorova S, Kashamo B and Sredkova V. Effect of *Tribulus terrestris* extract on semen quality and serum total cholesterol container in white plymouth rock- mini -cocks. *Biotech. Animal Husbandry* 2008; 24: 139 - 46.

33. Xu YJ, Xie SX and Zhao HF. Studies on the chemical constituents from *Tribulus Terrestris*. *Yao Xue Xue Bao*. 2001; 36: 750 - 3.

34. Brown AG, Vukovich MD and Martina ER. Endocrinae and lipid responses to chronic androstenediol herbal supplemtation in 30 to 58 years old men. *Jam. Coll. Nutr*. 2002; 20: 520 - 8.