DOI: 10.22055/IVJ.2021.238283.2282
DOR: 20.1001.1.17356873.1401.18.4.3.7

بررسی هم‌زمان سیکلوفسفامید و عصاره‌ی آبی گرده‌ی نخل بر کیفیت اسپرم و متعاقب آن رشد جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی در موش سوری

نرگس دل‌گرم[۱]، مجید مروتی‌شریف‌آباد[۲]*، الهام صالحی[۲]، محمد افخمی‌اردکانی[۳] و محمدسعید حیدرنژاد[۴]

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم جانوری، آموزشکده‌ی پیرادامپزشکی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران
[۲] دانشیار گروه علوم پایه، آموزشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران
[۳] دانش آموخته دکترای تخصصی بافت‌شناسی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
[۴] دانشیار گروه علوم جانوری، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

دریافت: ۱۳۹۹/۴/۱۶ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۵

چکیده

سیکلوفسفامید یکی از رایج‌ترین داروهای ضد سرطان می‌باشد. باعث آسیب به بافت بیضه و ناباروری می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی هم‌زمان سیکلوفسفامید و عصاره‌ی آبی گرده‌ی نخل بر کیفیت اسپرم و متعاقب آن رشد جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی در موش‌های سوری طراحی شد. در این مطالعه تجربی، ۳۶ موش سوری نر نژاد NMRI با وزن تقریبی۳۶-۳۰ گرم به طور تصادفی به ۶ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. پس از عادت یافتن با محیط به مدت یک هفته، تیمار تمامی گروه‌ها روزانه به مدت ۲۸ روز انجام شد. گروه‌ها به صورت گروه کنترل، گروه سیکلوفسفامید، دو گروه سیکلوفسفامید همراه با دوز mg/kg ۴۰۰ و ۲۰۰ گرده نخل و دو گروه، گرده نخل به تنهایی، با دوز mg/kg ۴۰۰ و ۲۰۰ تقسیم شدند. متعاقب توزین و تشریح جهت استحصال اسپرم تمامی حیوانات آسان‌کشی شدند. جهت تحریک تخمک‌گذاری با استفاده از PMSG و HCG از ۶ سر موش سوری ماده‌ی بالغ بارور استفاده شد. لقاح در محیط کشت HTF+BSA 4mg انجام شد. تخمک‌های لقاح یافته به مدت ۱۲۰ ساعت انکوبه شدند و مراحل رشد جنینی و میزان باروری داخل آزمایشگاهی در تمامی گروه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مطالعه نشان داد که درصد تخم لقاح یافته، جنین‌های دو سلولی، مورولا، بلاستوسیت و درصد جنین‌های هچ شده، در موش‌های گروه دریافت‌کننده‌ی سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار یافته است، اما فراسنجه‌های ذکر شده در موش‌های گروه دریافت‌کننده‌ی گرده‌ی نخل در دوزهای mg/kg ۴۰۰ و ۲۰۰ متعاقب تجویز سیکلوفسفامید نسبت به گروه سیکلوفسفامید افزایش معنی‌دار داشت. گروه سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری در درصد جنین‌های متوقف شده داشته است. درصد جنین‌های متوقف شده در موش‌های گروه دریافت‌کننده‌ی گرده‌ی نخل در دوزهای بالا و پایین متعاقب تجویز سیکلوفسفامید نسبت به گروه سیکلوفسفامید کاهش معنی‌دار نشان داد. عصاره‌ی آبی گرده‌ی نخل دارای اثر محافظتی در برابر سمیت ناشی از سیکلوفسفامید بر لقاح و روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی است.

کلمات کلیدی: موش سوری، گرده‌ی نخل، سیکلوفسفامید، لقاح آزمایشگاهی

مقدمه

سرطان در نتیجه‌ی تقسیم غیرقابل کنترل سلول‌ها در اثر عوامل محیطی و اختلالات ژنتیکی به وجود می‌آید (Rezvanfar et al. 2008). سیکلوفسفامید یک عامل آلکیله کننده و یکی از انواع داروهای شیمی‌درمانی است که اثرات

*نویسنده مسئول : مجید مروتی‌شریف‌آباد، دانشیار گروه علوم پایه، آموزشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران
E-mail: mmorovati@ardakan.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

دارویی چشم‌گیری در درمان بیماری‌های متعدد از جمله سرطان دارد (Ahmed & Dickens 2018). این دارو با عوارض جانبی متعددی همراه و از طریق القای استرس اکسیداتیو و افزایش سطح رادیکال‌های آزاد در بدن اثرگذار می‌باشند (Hosseini et al. 2010). به طور طبیعی اسپرم‌ها برای ظرفیت‌پذیری، واکنش آکروزومی و چسبندگی به تخمک، مقادیر اندکی ROS[1] در حالت طبیعی تولید می‌کنند. این مقدار ROS اضافی توسط آنتی‌اکسیدان‌های مایع انزال خنثی می‌شود. در صورتی که فعالیت این آنتی‌اکسیدان‌ها به دلایلی کاهش پیدا کند، استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد که عملکرد سلول، حیات و سایر پارامترهای آن را مختل می‌سازد (Shahidi & Zhong 2015). طبق مطالعات انجام شده در مایع منی مردان نابارور ۲۵-۴۵ درصد (ROS) وجود دارد که این مقدار بالای اکسیژن مبنی بر ناباروری می‌باشد (De Lamirande & Gagnon 1995). استرس اکسیداتیو دارای اثر مخرب روی تکامل جنین است. ROS ناشی از متابولیسم جنین یا از محیط اطراف، نه تنها باعث تغییر بیش‌تر مولکول‌های سلول می‌شود، بلکه باعث القای توقف و یا کندی در تکامل اولیه‌ی جنین نیز می‌شود (Momtahan et al. 2019). در همین راستا wan و همکارانش گزارش کردند افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها نسبت تکوین بلاستوسیت در جنین‌های موش را بهبود می‌بخشد (Chaudière et al. 1999). حضور آنتی‌اکسیدان‌ها وضعیت ثابتی از سطح ROS در پلاسمای سمینال ایجاد کرده و رادیکال‌های آزاد؛ اسپرم را در برابر ROS محافظت می‌کند (Sen&Chakraborty 2011). گیاهان دارویی در طول تاریخ پزشکی اهمیت زیادی داشته‌اند. یکی از این گیاهان، نخل خرما (*Phoenix dactylifera*) و از خانواده‌ی اریکاسه است (Mozaffarian 1390). گرده‌ی درخت نخل در ظاهر شبیه غبار و در زیر میکروسکوپ به رنگ زرد مایل به قهوه‌ای مشاهده می‌شود (Hashempour 1378). گرده‌ی نخل حاوی مواد ذخیره‌ای پروتئین، چربی، کربوهیدرات و منبع ویتامین‌های A, E, C و املاح معدنی از قبیل: عنصر بور، روی، سلنیوم، آهن، مولیبدون، مس، منگنز، کبالت، نیکل، اسید آمینه‌های اصلی و اسیدهای چرب است (Hassan 2011). عصاره‌ی آبی گرده‌ی نخل یک افزایش دهنده‌ی جنسی و به عنوان یک تحریک‌کننده پیش انزالی جهت بهبود بخشیدن به ناتوانی جنسی گزارش شده است. به علت وجود آلکالوئیدها، ساپونین و فلاونوئیدها میل جنسی را افزایش می‌دهد (Abedi et al. 2013). بر اساس مطالعات انجام شده میزان قابل توجهی عصاره‌ی الکلی گرده‌ی نخل در حفاظت و بهبود ساختمان بیضه در موش-های دیابتی مؤثر و بر تغییر مقدار تستوسترون بیضه ناشی از دیابت اثر تنظیم‌کنندگی داشته است (Kazeminia 2014). بنابراین به نظر می‌رسد آنتی‌اکسیدان‌های مختلف موجود در گرده‌ی نخل مانند فلاونوئید، کاروتنوئیدها و تانن‌ها مسیرهای ضد آپوپتوزی در سلول‌های کشت داده شده را مهار کنند و از این راه نقش مهمی در تعادل زنده ماندن و تکثیر سلول‌ها دارند (Abedi et al. 2014, Dostal et al. 1996) همچنین مطالعات Jashni & Jahromi در سال ۲۰۱۶ نشان داد که تأثیر گرده‌ی نخل بر روند فولیکولوژنز پس از درمان با سیکلوفسفامید در موش صحرایی باعث بهبود اثرات مضر سیکلوفسفامید می‌گردد (Jahromi & Jashni 2016). مطالعات انجام شده حاکی از آن است گیاهانی که دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند فلاونوئیدها هستند قادرند سمیت ناشی از تجویز سیکلوفسفامید را که سبب بروز استرس اکسیداتیو و افزایش رادیکال‌های آزاد هستند در بافت بیضه کاهش دهند. از آن جا که تا کنون اثر داروی گیاهی عصاره‌ی آبی گرده‌ی نخل به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در کاهش اثرات استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز سیکلوفسفامید بر روی رشد جنین‌های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی در موش‌های تحت درمان با

1- Reactive Oxygen Species

سیکلوفسفامید مورد مطالعه قرار نگرفته است، در این مطالعه بررسی هم‌زمان سیکلوفسفامید و عصاره‌ی آبی گرده‌ی نخل بر کیفیت اسپرم و متعاقب آن رشد جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی در موش‌های سوری مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد وروش کار

تهیه و آماده‌سازی داروی سیکلوفسفامید

داروی سیکلوفسفامید (Endoxan®,Baxter Oncology Gmbh, Gerrmany). ساخت کشور آلمان از داروخانه‌ی تخصصی بیمارستان یزد خریداری شد و به صورت تک دوز (Mg/kg/BW) ۱۰۰ ، به صورت داخل صفاقی تزریق شد.در این مطالعه با توجه به میانگین وزن موش ها(۲±۳۳/۴۴ گرم)(تعداد:۱۸ سر) که دریافت کننده داروی سیکلوفسفامید بودند،به ازاء هر موش ۰۰۳۳/گرم از پودر داروی سیکلوفسفامیددر ۰/۲ میلی لیتر اب مقطر استریل حل شد و با سرنگ انسولین به صورت داخل صفاقی تزریق شد (Selvakumarand et al. 2006).

تهیه و آماده‌سازی عصاره‌ی آبی گرده‌ی نخل

گرده‌های خریداری شده، از نخلستان‌های استان خوزستان، جمع‌آوری شده بود. سپس عصاره این گرده‌ها با دو غلظت مختلف جهت گاواژ استخراج گردید، بدین صورت که بر حسب میانگین وزن موش‌ها (۶ سر موش دریافت کننده عصاره با دوز پایین و ۶ سرموش دریافت کننده عصاره با دوز پایین به همراه سیکلوفسفامید با میانگین وزنی ۳۳/۶۷ گرم)برای تهیه‌ی دوزmg/kg ۲۰۰ ،به ازاءهر سر موش ۰/۰۰۶۷g پودر گرده‌ی نخل توسط ترازو وزن شد و برای ۱۲ سر موش ۰/۰۸۰۴ گرم پودر گرده‌ی نخل توسط ترازو وزن شد ودر ۱۲ میلی لیتر آب مقطر استریل حل شد. سپس توسط کاغذ صافی محلول صاف گردید وبه هر موش ۱ میلی از محلول فوق به صورت گاواژ (خوراکی)خورانده شد. برای تهیه‌ی دوزmg/kg ۴۰۰ (۶ سر موش دریافت کننده عصاره با دوز بالا و ۶ سرموش دریافت کننده عصاره با دوز بالا به همراه سیکلوفسفامید با میانگین وزنی ۳۴/۸۳ گرم)، به ازاءهر سر موش ۰/۰۱۳۹g پودر گرده‌ی نخل توسط ترازو وزن شد و برای ۱۲ سر موش ۰/۱۶۶۸ گرم پودر گرده‌ی نخل توسط ترازو وزن شد و در ۱۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شد؛ سپس توسط کاغذ صافی محلول صاف گردید وبه هر موش ۱ میلی لیتر از محلول فوق به صورت گاواژ (خوراکی)خورانده شد. (Shafiei Sarvestani 1378).

حیوانات آزمایشگاهی

در این مطالعه‌ی تجربی تعداد ۳۶ سر موش سوری نر نژاد NMRI با وزن تقریبی ۳۶-۳۰ گرم از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی مرکز ناباروری یزد تهیه گردید. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و در دمای ۱±۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۱۰±۵۰ درصد به مدت ۳۵ روز در قفس‌هایی از جنس پروپیلن نگهداری شدند. پس از عادت یافتن حیوانات با محیط به مدت یک هفته، تیمار تمامی گروه‌ها روزانه به مدت ۲۸ روز انجام شد و حیوانات به طور تصادفی به ۶ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه اول: این گروه به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد (صرفاً آب مقطر دریافت کردند). گروه دوم: سیکلوفسفامید را به میزان Mg/kg ۱۰۰ به صورت تک دوز و داخل صفاقی دریافت کردند. گروه سوم: سیکلوفسفامید را به میزان Mg/kg۱۰۰ به صورت تک دوز، داخل صفاقی و روزانه Mg/kg ۲۰۰ عصاره‌ی آبی گرده‌ی نخل را به صورت خوراکی دریافت کردند. گروه چهارم سیکلوفسفامید را به میزان Mg/kg ۱۰۰ به صورت تک دوز، داخل صفاقی و روزانه Mg/kg۴۰۰ عصاره‌ی آبی گرده‌ی نخل را به صورت خوراکی دریافت کردند. گروه پنجم: حیوانات این گروه روزانه Mg/kg ۲۰۰ عصاره‌ی آبی گرده‌ی نخل دریافت کردند. گروه ششم: حیوانات این گروه روزانه Mg/kg ۴۰۰ عصاره‌ی آبی گرده-ی نخل دریافت کردند (Mousavi Tometri 2018). ۲۴

ساعت پس از آخرین تیمار، حیوانات به طور دقیق وزن و از طریق جابه‌جایی مهره‌های گردنی آسان‌کشی شدند.

آماده کردن موش‌ها برای لقاح آزمایشگاهی (تخمک گیری)

برای انجام این مطالعه به تحریک تخمک‌گذاری نیاز بود که بدین منظور پس از پایان دوره درمان، جهت تحریک تخمک‌گذاری ۷۲ ساعت قبل از لقاح آزمایشگاهی ابتدا موش‌های ماده‌ی بالغ جهت تنظیم سیکل جنسی در چرخه-ی نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. سپس موش‌های سوری ماده‌ی بالغ جوان آماده‌ی تحریک تخمک‌گذاری شدند. برای این کار میزان ۱۰ واحد بین‌المللی (IU) هورمون گنادوتروپین مادیان آبستن (PMSG) شرکت (Folligon–هلند) به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر به روش داخل صفاقی تزریق شد. ۴۸ ساعت بعد از تزریق، هورمون گنادوتروپین جفت انسان (HCG) ساخت شرکت (Folligon –هلند) را به میزان ۱۰ واحد (IU) به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از طریق داخل صفاقی به همان موش ماده تزریق شد. عمل تخمک‌گذاری ۱۳ساعت بعد از تزریق HCG انجام شد. یک روز قبل از عمل لقاح محیط کشت برای اسپرم و تخمک تهیه شد، سپس به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور $5\%CO_2$ در دمای۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. پتری دیش‌های لقاح با محیط کشت HTF قطره-گذاری شدند. چندین قطره‌ی ۱۰ میکرولیتری و چندین قطره‌ی ۱۰۰ میکرولیتری برای شستشو در پتری دیش‌های استریل حاوی محیط کشت گذاشته شدند و روی آن‌ها با روغن معدنی پوشانده شد. گروه‌های مختلف بعد از لقاح برای انجام (In Vitro Culture) در محیط کشت HTF به صورت قطره‌های ۱۰۰ میکرولیتری در پتری‌دیش قطره-گذاری شده، کشت شدند (Oh & Funahashi 1998). حدود ۱۰-۱۲ ساعت (صبح روز بعد) پس از تزریق HCG موش‌های ماده به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی آسان-کشی شدند. سپس لوله‌های رحمی (اوویداکت) جدا شده و در داخل محیط کشت که از قبل به تعادل رسیده بود در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گذاشته شدند. تخمک‌ها به همراه توده‌ی کومولوسی پس از تکنیک شکافتن توسط سرنگ انسولین از ناحیه‌ی آمپول و اویداکت در زیر لوپ خارج شدند و پس از شستشو در داخل قطرات لقاح ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت HTF دارای BSA، به میزان ۴mg/ml زیر روغن معدنی (*Mineral oil sigma*) انتقال یافتند. سپس اسپرم‌ها که مرحله‌ی ظرفیت‌پذیری (با ایجاد برش در ناحیه‌ی شکم و بعد از جدا کردن بافت‌های اطراف، دم اپیدیدیم از بیضه جدا شد و در میکروتیوب حاوی ml ۱ محیط کشت HTF قرار گرفت. این محیط قبلا جهت تعادل در داخل انکوباتور قرار داده شده بود. پس از ایجاد چند برش، دم اپیدیدیم به قطعات ریز تقسیم شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در داخل انکوباتور $5\% CO2$ قرار گرفت. بعد از گذشت ۶۰ دقیقه اسپرم‌ها خارج شده و در محیط کشت پخش شدند. پس از ظرفیت یابی اسپرم‌ها به قطرات لقاح اضافه شدند و به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت افزوده شدند. جهت بررسی جنین‌ها، تهیه‌ی محیط کشت در شرایط کاملاً استریل و در زیر هود انجام گرفت. محاسبه‌ی درصد سلول‌های تخم، جنین‌های دو سلولی و بلاستوسیت‌ها: پس از مرحله‌ی لقاح، میزان باروری آزمایشگاهی و روند رشد رویانی در زیر میکروسکوپ اینورت ارزیابی شد. به ترتیب مراحل انجام شده شامل: ۱- ارزیابی پیش هسته حدود ۴ الی۶ ساعت پس از اضافه کردن اسپرم به قطرات لقاح و شستشوی اووسیت‌های لقاح یافته با مشاهده پیش هسته‌های نر و ماده و دومین گویچه‌ی قطبی هر گروه بررسی شد و درصد لقاح هر گروه بیان گردید ۲-ارزیابی میزان رشد ازمایشگاهی جنین: ۲۴ ساعت پس از قرار دادن پتری‌دیش‌ها داخل انکوباتور ۳- درصد رویان‌های دو سلولی، پس از ۴ الی ۵ روز و درصد رویان‌های بلاستوسیست‌ها مورد ارزیابی قرارگرفت (Oh &Funahashi 1998).

بررسی آماری

داده‌های حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم‌افزارآماری Minitab و روش آماری پروپیورشن-۲

(مقایسه نسبت‌ها) تجزیه و تحلیل شدند و اختلاف در سطح $P<0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج مقایسه‌ی میانگین نشان داد که درصد تخم لقاح یافته و درصد جنین‌های دو سلولی در موش‌های گروه دریافت‌کننده‌ی سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار یافته است ($P<0.05$) در حالی که فراسنجه‌های ذکر شده در موش‌های گروه دریافت‌کننده گرده‌ی نخل در دوزهای بالا و پایین متعاقب تجویز سیکلوفسفامید نسبت به گروه سیکلوفسفامید افزایش معنی‌دار داشت ($P<0.05$). همچنین در این گروه‌ها درصد تخم لقاح یافته و درصد جنین‌های دو سلولی نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌دار نشان داد ($P<0.05$). در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی گرده‌ی نخل در دوزهای بالا و پایین نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌دار در درصد تخم لقاح یافته مشهود بود ($P<0.05$). ولی درصد جنین‌های دو سلولی تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل نشان نداد ($P<0.05$) (Table1, Fig1 A,B). گروه سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری در درصد مورولا و بلاستوسیت و درصد جنین‌های هچ شده داشته است ($P<0.05$). درصد مورولا، بلاستوسیت، درصد جنین‌های هچ شده در موش‌های گروه دریافت‌کننده‌ی گرده‌ی نخل در دوزهای بالا و پایین متعاقب تجویز سیکلوفسفامید نسبت به گروه سیکلوفسفامید افزایش معنی‌دار نشان داد ($P<0.05$). همچنین در این گروه‌ها درصد مورولا، بلاستوسیت و جنین‌های هچ شده نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌دار نشان داد ($P<0.05$). درصد مورولا در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی گرده‌ی نخل در دوزهای بالا اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل داشت ($P<0.05$). اما دوز پایین گرده‌ی نخل نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌دار در درصد مورولا نشان نداد. بین موش‌های گروه دریافت کننده‌ی سیکلوفسفامید به همراه دوز پایین و بالا گرده‌ی نخل تفاوت معنی‌دار در درصد بلاستوسیت مشاهده شد ($P<0.05$). درصد بلاستوسیت در موش‌های گروه دریافت کننده دوز بالا و پایین گرده‌ی نخل تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نشان نداد. بین موش‌های گروه دریافت کننده‌ی سیکلوفسفامید به همراه دوز پایین و بالا گرده‌ی نخل تفاوت معنی‌دار در درصد جنین‌های هچ شده مشاهده شد ($P<0.05$). در موش‌های گروه دریافت کننده‌ی دوز پایین گرده‌ی نخل تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل مشهود نبود. اما درصد جنین‌های هچ شده در موش‌های گروه دریافت کننده‌ی دوز بالا اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل نشان داد ($P<0.05$) (Table1, Fig1 D,E). همچنین که گروه سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری در درصد جنین‌های متوقف شده داشته است ($P<0.05$). درصد جنین‌های متوقف شده در موش‌های گروه دریافت‌کننده‌ی گرده‌ی نخل در دوزهای بالا و پایین متعاقب تجویز سیکلوفسفامید نسبت به گروه سیکلوفسفامید کاهش معنی‌دار نشان داد ($P<0.05$) همچنین در این گروه‌ها درصد جنین‌های متوقف شده نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌دار را نشان داد ($P<0.05$). بین موش‌های گروه دریافت کننده‌ی سیکلوفسفامید به همراه دوز پایین و بالا گرده‌ی نخل تفاوت معنی‌دار در درصد جنین‌های متوقف شده مشاهده شد ($P<0.05$). در موش‌های گروه دریافت کننده‌ی دوز پایین و بالا گرده‌ی نخل اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل مشهود نبود (Table1, Fig1 F).

Table 1: Results of in vitro fertilization in different groups

Group	Fertilization (percentage)	twocelledembryos (percentage)	Morula (percentage)	Blastocysts (percentage)	Hatchedembryos (percentage)	Stoppedembryos (percentage)
Control	83/67	72/04	70/33	33/63	75/55	67/27
Cyclophosphamide	01/49 a	35/27 a	32/24 a	67/22 a	40/16 a	40/56 a
high doses of palm pollen	67/94 a,b	16/77 b	70/74 a,b	67/62 b	25/59 a,b	50/26 b
low doses of palm pollen	39/92 a,b	70/74 b	98/73 b	67/59 b	33/57 b	33/28 b
cyclophosphamide groups with high doses of palm pollen	39/78 a,b,c,d	67/63 a,b,c,d	48/57 a,b,c,d	75/56 a,b,c,d,e	00/52 a,b,c,d,e	50/31 a,b,c,d,e
cyclophosphamide groups with low doses of palm pollen	33/76 a,b,c,d	33/60 a,b,c,d	33/56 a,b,c,d	/۶۷55 a,b,c,d	50/46 a,b,c,d	00/35 a,b,c,d

Represent significant differences from
a :Control group (P <0.05)
b : Represent significant differences from cyclophosphamide group (P <0.05)
c : Represent significant differences from high doses of palm pollen group (P <0.05)
d: Represent significant differences from low doses of palm pollen group (P <0.05)
e: Represent significant differences from cyclophosphamide groups with low doses of palm pollen (P <0.05)

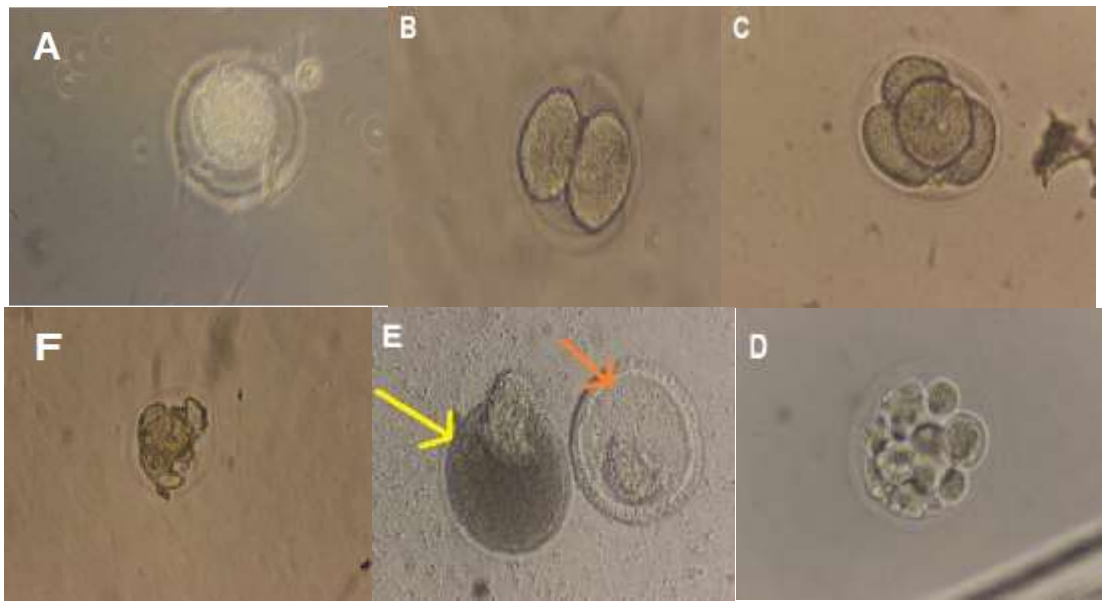

Fig1: Fig 1-Royan growth in the culture area under invert microscope with X400 magnification. As shown in the fig(A) fertilized oocyte with a male pronucleus and a female pronucleus is visible.5 hours after conception, one healthy embryo in a two-cell stage (B), Embryo in the 4-cell stage(C), One embryo in dense morula stage, three to four days after embryo culture in HTF medium(D). The embryo in the blastocyst stage :yellow arrow (E).one blastocyte embryo is hatched three to four days after the culture of the embryos: orange arrow (E) .one fragmented and lysis embryo 24 hours after embryo culture following cyclophosphamide administration (F).

بحث

یافته‌های این مطالعه نشان داد که تجویز داروی سیکلوفسفامید در نتایج حاصل از لقاح آزمایشگاهی اثرات منفی دارد و باعث کاهش معنی‌داری در درصد لقاح، درصد جنین‌های دو سلولی، چهار سلولی، مورولا، بلاستوسیت‌ها و درصد جنین‌های هچ شده و افزایش معنی‌دار در درصد جنین‌های متوقف شده، می‌شود. این مشاهدات بیان‌گر اثرات سمی سیکلوفسفامید بر فعالیت‌های تولید مثلی از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو می‌باشد. از طرفی استفاده

از عصاره‌ی آبی گرده‌ی نخل به طور هم زمان به همراه سیکلوفسفامید به عنوان یک آنتی‌اکسیدان برای کاهش اثرات منفی سیکلوفسفامید در دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی-گرم بر کیلوگرم اثرات سمی دارو را جبران نمود و درصد لقاح، جنین‌های دو سلولی، درصد بلاستوسیت و درصد جنین‌های هچ شده را افزایش داد و سبب افزایش کیفیت و رشد جنین‌ها در محیط آزمایشگاه شد. سیکلوفسفامید یکی از انوع داروهای شیمی درمانی است. یکی از مهم‌ترین عوارض جانبی سیکلوفسفامید اثر مخرب بر ارگان‌های جنسی و تغییر عملکرد سیستم تناسلی در جنس نر و ماده می‌باشد و ممکن است منجر به ناباروری شود (Mousavi et al. 2015). در مطالعات Iranian Fam و همکاران گزارش شده است که داروی سیکلوفسفامید سبب افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های اسپرمی و در نهایت کاهش تعداد سلول‌های زایا شده و از طریق برهم زدن تعادل اکسیداسیون –احیا موجب بروز استرس‌های اکسیداتیو، اختلال در روند اسپرماتوژنز و در نهایت مسمومیت تولیدمثلی می‌شود (Iranian Fam et al. 2016). در همین راستا گزارش شده در تشکیل تخمک‌ها در تخمدان و شکل‌گیری اسپرم‌ها در بیضه تداخل ایجاد می‌کند و ناباروری در هر دو جنس را موجب می‌گردد (Korkmaz 2007). که با نتایج مطالعه‌ی حاضر بر روی اثر سیکلوفسفامید بر کاهش اسپرماتوژنز همخوانی دارد. یون هیدروکسیل، سوپراکسید، پراکسیدهیدروژن، رادیکال پروکسی و یون هیپوکلریت، گونه‌های فعال اکسیژن و عوامل اکسیدکننده‌ی بسیار فعالی از گروه رادیکال‌های آزاد هستند (Armstrong & Stratton 2016). به طور طبیعی اسپرم برای ظرفیت‌پذیری، واکنش آکروزومی و چسبندگی به تخمک مقادیر اندکی ROS در حالت طبیعی تولید می‌کنند. این مقدار ROS اضافی توسط آنتی‌اکسیدان‌های مایع انزال خنثی می‌شود. در صورتی که فعالیت این آنتی‌اکسیدان‌ها به دلایلی کاهش پیدا کند، استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد که عملکرد سلول، حیات آن و سایر پارامترهای آن را مختل می‌سازد (Shahidi & Zhong 2015). این رادیکال‌های آزاد به شدت ناپایدار می‌باشند و سریعاً با مولکول‌های زیستی واکنش نشان می‌دهند و منجر به ایجاد و گسترش انواع آسیب‌های سلولی از جمله پراکسیداسیون غشای پلاسمایی اکسیداسیون اسیدهای آمینه و نوکلئیک، آپوپتوز و نکروز می‌شود که در نهایت منجر به کاهش قدرت زیست‌پذیری و تکوین جنین‌ها در محیط کشت می-گردد (Guerin et al. 2001) که با مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد. یافته‌های مطالعه‌ی حاضر نشان دادند سیکلوفسفامید باعث افزایش درصد جنین‌های متوقف شده می‌شود که می‌توان نتیجه گرفت سیکلوفسفامید با تولید ROS مانع رشد جنین‌ها می‌شود، بنابراین به منظور کاهش اثرات استرس اکسیداتیو ناشی از به کارگیری سیکلوفسفامید می-توان از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی که تخریب ناشی از ROS را کاهش می‌دهند استفاده کرد. در واقع برای مقابله با آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد، سیستمی به نام سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی وجود دارد که این سیستم مواد مغذی هستند و می‌توانند از تخریب سلول‌های بدن جلوگیری کنند. داروهای گیاهی به دلیل مواد مؤثره‌ی موجود در آن و همراه بودن آن‌ها با مواد دیگر پیوسته از یک حالت تعادل بیولوژیک برخودار هستند که در بدن انباشته نمی‌شود و اثرات جانبی به بار نمی‌آورند. به همین جهت برتری قابل ملاحظه‌ای نسبت به داروهای شیمیایی نشان می‌دهند (Zamani 2000). بر اساس یافته‌های محققان مصرف برخی از داروهای گیاهی می تواند در باروری عمومی و رفع ناتوانی جنسی ناشی از تعداد کم اسپرم، التهاب پروستات و حرکت کند اسپرم تأثیر مثبت داشته باشد (Falahati &Malekzadeh 2016). گیاهان دارویی به خصوص گیاهانی که سرشار از ترکیبات پلی‌فنولی و فلاونوئیدی هستند با دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، موجب افزایش اسپرم، کاهش اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی و همچنین باعث افزایش درصد لقاح می‌شود (Iranianfam 2016). در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی در مورد خرما و تأثیر مواد شیمیایی آن بر اندام‌های مختلف

و مواد متشکله‌ی آن صورت گرفته است از جمله: TRF[1] ایزوله شده از روغن خرما که از پرولیفراسیون سلول‌های سرطانی سینه جلوگیری می‌کند (Nesaretnam 1992). همچنین قدرت مهار پراکسیداسیون چربی‌ها و اکسیداسیون پروتئین‌های میتوکندری‌های مغز و میکروزوم‌های کبد موش را دارد (Pereira & Das 1990) از پودر هسته‌ی نخل در درمان بیماری‌هایی از قبیل پیری زودرس، کم‌خونی و ضعف قوای جنسی بهره‌گیری شده است (Dornbusch 1981). عصاره‌ی الکلی گرده‌ی نخل به میزان قابل توجهی در حفاظت و بهبود ساختمان بیضه در موش‌های دیابتی مؤثر بوده است و بر تغییر مقدار تستوسترون بیضه ناشی از دیابت اثر تنظیم کنندگی دارد (Kazeminia et al. 2014). همچنین استفاده از عصاره‌ی آبی گرده‌ی نخل به علت وجود آلکالوئیدها، ساپونین و فلاونوئیدها میل جنسی را افزایش می‌دهد (Abedi et al. 2013). نتایج مطالعات پیشین نشان می‌دهد آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند در بهبود اثرات مخرب سیکلوفسفامید مفید باشند (Afkhami-Ardakan 2017). همچنین محققان در مطالعات پیشین نشان داده‌اند گرده‌ی نخل منبع جدیدی از عوامل ضدسرطانی غیرسمی است که به عنوان یک مکمل غذایی در پیش درمانی سرطان استفاده می‌شود (Rasouli 2018). مطالعات محققین دیگر نشان می‌دهد عصاره‌ی آبی گرده‌ی نخل دارای خواص محافظتی بر روی استرس اکسیداتیو حاصل از پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از سیکلوفسفامید است (Arbabian et al. 2018) که همگی با مطالعه‌ی حاضر همسو می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد به علت وجود آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در گرده‌ی نخل مانند فلاونوئید، کاروتنوئیدها و تانن‌ها که مسیرهای ضد آپوپتوزی در سلول‌های کشت داده شده را مهار می‌کنند، نقش مهمی که این ترکیب در تعادل زنده ماندن و تکثیر سلول‌ها دارد قابل توجیه باشد (Abedi 2014). در نتیجه‌گیری نهایی از این مطالعه می‌توان اظهار نمود که به کارگیری عصاره‌ی آبی گرده‌ی نخل با دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم متعاقب تجویز سیکلوفسفامید می‌تواند از اثرات مخرب سیکلوفسفامید بکاهد و نتایج حاصل از لقاح آزمایشگاهی را بهبود بخشد.

در مطالعه‌ی حاضر، گرده‌ی نخل افزایش معنی‌داری در درصد لقاح، جنین‌های دو سلولی، مورولا، بلاستوسیتبلاستوسیت هچ شده و کاهش معنی‌داری در درصد جنین‌های متوقف شده نسبت به گروه سیکلوفسفامید نشان داد. سمیت تولیدمثلی ناشی از تجویز سیکلوفسفامید به واسطه‌ی استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد و یک آنتی‌اکسیدان قوی مانند گرده‌ی نخل سیستم تولید مثلی را از آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو ایجاد شده به وسیله‌ی سیکلوفسفامید که اغلب موجب ناباروری می‌شود، محافظت می‌نماید به طوری که در مطالعه‌ی حاضر گرده‌ی نخل به علت دارا بودن خواص کارتنوئیدی-ترکیبات پلی-فنلی و فلاونوئیدی با خواص آنتی‌اکسیدانی، سمیت ناشی از سیکلوفسفامید را کاهش داد و در افزایش کیفیت سلول-های جنسی میزان لقاح، بهبود روند رشد جنین‌ها در محیط آزمایشگاه و کاهش توقف در مراحل مختلف رشد جنینی مؤثر واقع شد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از سرکار خانم دکتر مهین دهستانی و تمام کسانی که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

1 Tocotrienol Rich Fraction

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع مالی

هزینه این پایان نامه در قالب پژوهانه از دانشگاه اردکان تأمین شده است.

منابع

Abedi, A.; Karimian, S. M.; Parviz, M.; Mohammadi, P. &Roudsari, H. R. S. (2014). Effect of aqueous extract of *Phoenix dactylifera pollen* on dopamine system of nucleus accumbens in male rats. Neuroscience &medicine, 5(01): 49.

Abedi, A.; Parviz, M.; Karimian, S. M. &Rodsari, H. R. S. (2013). Aphrodisiac activity of aqueous extract of *Phoenix dactylifera pollen* in male rats. Advances in Sexual Medicine, 3(01): 28.

Afkhami-Ardakani, M., Hassanzadeh, S., Shahrooz, R., Asadi-Samani, M., Latifi, M., & Luther, T. (2017). Phytotherapy & phytopharmacology for reduction of cyclophosphamide-induced toxicity in the male urinary system. Journal of Renal Injury Prevention, 6(3): 164-170.

Al-Gboori, B. & Krepl, V. (2010). Importance of date palms as a source of nutrition. Agricultura Tropica et Subtropica, 43(4): 348-351.

Amjad, L. Master Thesisof Science in Plant Science.Tehran Teacher Training University. 1998 (in Persian)

Arbabian, M.; Amir zadgan, M.; Tvalaee, M. & Nasr Asfahani, M. (2018). Oxidative stress & its effects on male infertility: An overview article. Scientific Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, 17 (3): 253-274. (in Persian)

Armstrong, D. & Stratton, R. (2016). Oxidative Stress & Antioxidant Protection. John Willy and Sons.

Bahmanpour, S.; Talaei, T.; Vojdani, Z.; Panjehshahin, M.; Poostpasand, A.; Zareei, S. & Ghaeminia, M. (2006). Effect of *Phoenix dactylifera pollen* on sperm parameters & reproductive system of adult male rats. Iranian Journal of medical sciences, 31(4).

Chaudière, J. & Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. Food & chemical toxicology, 37(9-10): 949-962

De Lamirande, E. & Gagnon, C. (1995). Impact of reactive oxygen species on *spermatozoa*: a balancing act between beneficial & detrimental effects. Human Reproduction, 10(suppl_1), 15-21.

Dickens, E. & Ahmed, S. (2018). Principles of cancer treatment by chemotherapy. Surgery (Oxford), 36(3): 134-138

Dornbusch, S.M.; Carlsmith, J. M.; Gross, R. T.; Martin, J. A.; Jennings, D.; Rosenberg, A. &D uke, P. (1981). Sexual development, age, & dating: Acomparison of biological & social influences upon one set of behaviors. ChildDevelopment,52(1) :179-85

Dostal, L. A., Faber, C. K., & Zandee, J. (1996). Sperm motion parameters in vas deferens & cauda epididymal rat sperm. Reproductive Toxicology, 10(3), 231-235.

Falahati, A. M. (2016). Study of the effect of date *palm pollen* on the expression of PRDX1 & PRDX6 antioxidant genes in infertile men (Doctoral dissertation, Hormozgan University of Medical Sciences). (in Persian).

Guerin, P.; El Mouatassim, S. & Menezo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo & its surroundings. Human reproduction update, 7(2): 175-189.

Hashem pour, M. (1999). Date treasure. first Volume (general). Tehran, Agricultural Education Publishing: 668. (in Persian)

Hassan, H. M. (2011). Chemical composition & nutritional value of *palm pollen grains*. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry Research, 6(1): 1-7.

Hosseini, A.; Zare, S.; Pakdel, F. G. & Ahmadi, A. (2010). Effects of *vitamin E & Ginseng* extract on fertility changes inducedby cyclophosphamide in rats. Journal of Reproduction & Infertility, 11 (14).

Iranifam, N.; Hasan zadeh, Sh. & Najafi GH. (2016). Effect of Hydroalcoholic Flower Extraction on *Yarrow* on In vitro Fertilization and Fetal Growth Process In Small Laboratory White Mouse. Qom Journal of Medical Sciences, 10 (11): 25- 33. (in Persian)

Jashni, H. K., & Jahromi, H. K. (2016). Effects of *palm pollen* on folliculogenesis process after treatment with cyclophosphamide among rats. Journal of Fundamental and Applied Sciences, 8(4): 1998-2007

Johnson, D. (2011). Introduction: date palm biotechnology from theory to practice. In Date palm biotechnology .Springer : 1-11

Kazeminia, S. M.; Kalaee, S. E. V. & Nasri, S. (2014). Effect of Dietary Intake Alcoholic Extract of *Palm Pollen* (*L. Phoenix dactylifera*) on Pituitary-Testicular Axis in Male Diabetic Rats. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences, 24: 167S-175S.

Khakzad Bonab, F. (2015). Evaluation of the protective effect of hydro-alcoholic extract of the fruit of the plant "to" *Cydonia oblonga Miller quince* on spermatogenesis process in male rats under chemotherapy. End - Master's thesis, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz. (in Persian)

Koppers, A. J.; De Iuliis, G. N.; Finnie, J. M.; McLaughlin, E. A. & Aitken, R. J. (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 93(8): 3199-3207

Korkmaz, M. (2007). The effects of leadership styles on organizational health. Educational Research Quarterly, 30(3): 23-55.

Lenzi, A.; Culasso, F.; Gandini, L.; Lombardo, F. & Dondero, F. (1993). Andrology: Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. Human Reproduction, 8(10): 1657-1662.

Momtahan, N.; Crosby, C. O. & Zoldan, J. (2019). The Role of Reactive Oxygen Species in In Vitro Cardiac Maturation. Trends in molecular medicine,25(6):482-493

Mousavi, M.; Jaafari barmak, M.; Nik serasht, M.; Sadeghi, H.; Hadayatpour, A.; Aobiadi, H. & Mahmodi, R. (2015). The protective effect of ellagic acid on the toxicity induced by cyclophosphamide on the ovaries of rats. Journal Armaghan-e-Danesh, 20 (7): 601- 610. (in Persian).

Mousavi Tometri, Golchin, Hassanzadeh, Shapour, Malekinejad, & Najafi Tazand. (2018). Protective effect of *Spirulina* (*Arthospira platensis*) on in vitro fertilization and fetal growth in mice receiving cyclophosphamide. Journal of Fasa University of Medical Sciences, 8 (2): 785-794. (in Persian)

Mozaferian, V. (2011). Plant classification. Tehran, Amirkabir Publications,: 355- 357. (in Persian)

Nesaretnam, K.; khor, H.T. & Ganeson, J. (1992). the effect of Vitamin E Tocotrienols from *palm oil* on chemically Induced Mammary carcinogenesis in female rats, Nutrition Research and Practice. 12: 879-892.

Oh, S. H.; Miyoshi, K& Funahashi, H. (1998). Rat oocytes fertilized in modified rat 1-cell embryo culture medium containing a high sodium chloride concentration & bovine serum albumin maintain developmental ability to the blastocyst stage. Biology of reproduction, 59(4): 884-889.

Pereira, T. A.; Sinniah, R. & Das, N. P. (1990). Effect of dietary *palm oil* on lipoprotein lipases: lipoprotein levels & tissue lipids in rat. Biochemical medicine & metabolic biology, 44(3): 207-217

Rasouli, H.; Norooznezhad, A. H.; Rashidi, T.; Hoseinkhani, Z.; Mahnam, A.; Tarlan, M. &Mansouri, K. (2018). Comparative in vitro/theoretical studies on the anti-angiogenic activity of date *pollen* hydro-alcoholic extract: Highlighting the important roles of its hot polyphenols. BioImpacts, 8(4): 281.

Rezvanfar, M.; Sadrkhanlou, R.; Ahmadi, A.; Shojaei-Sadee, H.; Rezvanfar, M.; Mohammadirad, A& Abdollahi, M. (2008). Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, &DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. Human & experimental toxicology, 27(12): 901-910

Selvakumar, E.; Prahalathan, C.; Mythili, Y. & Varalakshmi, P. (2004). Protective effect of dl-α-lipoic acid in cyclophosphamide induced oxidative injury in rat testis. Reproductive Toxicology, 19 (2): 163-167.

Sen, S. & Chakraborty, R. (2011). The role of antioxidants in human health. In Oxidative stress: diagnostics, prevention, & therapy, ACS Publications : 1-37.

Shafiee, M. (1999). Investigation of the effect of *phoenix dactliyfera* on *pollen* grains on histological changes of testicles & spermatogenesis of Syrian mice Blb / c. Master of Science in Animal Sciences (Developmental Orientation). Tehran Teacher Training University. (in Persian)

Sikka, S. C. (2001). Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. Current medicinal chemistry, 8(7): 851-862.

Singh, M.; Singh, K. P.; Shukla, S. & Dikshit, M. (2015). Assessment of in-utero *venlafaxine* induced, ROS-mediated, apoptotic neurodegeneration in fetal neocortex & neurobehavioral sequelae in rat offspring. International Journal of Developmental Neuroscience, 40: 60-69.

Zamani, S.(2020). Medicinal Plants.Method of cultivation, harvesting and color illustration,Mosalla publication: 376

Received: 06.07.2020
Accepted: 13.02.2021

Vol. 18, No. 4, Winter, 2023 **Original Article**

DOI: 10.22055/IVJ.2021.238283.2282
DOR: 20.1001.1.17356873.1401.18.4.3.7

Simultaneous evaluation of cyclophosphamide and aqueous extract of palm pollen in vitro fertilization on sperm quality and subsequent embryo development in Mice

Narges Delgarm[1], Majid Morovati-Sharifabad[2*], Elham Salehi[2], Mohammad Afkhami-ardakani[3], and Mohammad Saeed Heydarnejad[4]

[1] Msc, Department of Basic sciences, Ardakan university, Ardakan, Iran
[2] Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ardakan University, Ardakan, Iran
[3] PhD Graduate of Histology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
[4] Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Received: 06.07.2020 Accepted: 13.02.2021

Abstract

Palm pollen is one of the traditional medicinal plants with potential antioxidant properties that is used to treat infertility.The aim of this study was to investigate the protective effects of palm pollen on the growth process of embryos obtained from laboratory fertilization following cyclophosphamide administration. In this experimental study, 36 NMRI male mice weighing approximately 36-30 g were randomly divided into 6 groups: after adapting to the environment for one week, all groups were treated daily for 28 days.The Groups included the control group, Cyclophosphamide, Cyclophosphamide with high and low dosages of palm pollen and two groups palm pollen alone, with high and low doses. Subsequently, weighing and necropsy were done, all animals were euthanized for stimulate ovulation using PMSG and HCG and 6 adult fertile mice were used. Fertilization was assessed in HTF + 4mg BSA culture medium, fertilized eggs incubated for 120 hours. Embryonic developmental stages and intra-laboratory fertility rates in all groups were investigated. The results showed that the percentage of fertilized eggs, two-celled embryos, morula, blastocysts and the percentage of hatched embryos in Cyclophosphamide group decreased significantly compared to the control group. Cyclophosphamide and palm pollen group with high and low dosages, showed significant increase compared to Cyclophosphamide group. The Cyclophosphamide group had a significant increase in the percentage of stopped embryos compared to the control group. The percentage of stopped embryos in mice receiving the palm pollen with high and low dosages showed a significant decrease after Cyclophosphamide administration compared to Cyclophosphamide group. Palm pollen following Cyclophosphamide administration improved the growth process of embryos obtained from laboratory fertilization.

Keywords: Mice, Palm pollen, Cyclophosphamide, Laboratory fertilization

* **Corresponding Author**: Majid Morovati-Sharifabad, Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ardakan University, Ardakan, Iran
E-mail: mmorovati@ardakan.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).