[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.35]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 7:00 IRST on Saturday January 16th 2021

مطالعه اثرات محافظتی کروسین بر هیستومورفومتری و رشد و آترزی فولیکول‌های تخمدانی درموش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی تحت درمان با بوسولفان

حمیدرضا حسن زاده خانمیری[۱]، رسول شهروز[۱*]، شاپور حسن زاده[۱]، غلامرضا نجفی[۱]

۱) گروه علوم پایه، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۴

چکیده

مقدمه: استرس اکسیداتیو ناشی از درمان با بوسولفان موجب کاهش قدرت باروری می گردد، لذا در این تحقیق نقش محافظتی کروسین بر تغییرات بافت شناسی تخمدان مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این بررسی ۳۰ سر موش کوچک آزمایشگاهی نژاد NMRI بالغ با وزن ۲۵-۲۲ گرم در ۶ گروه مساوی در یک دوره ۲۱ روزه مورد مطالعه قرار گرفتند. گروه کنترل حلال بوسولفان(DMSO+PBS) به صورت داخل صفاقی(IP) تک دوز به حجم ۰/۱ ml و گروه کنترل شم فقط بوسولفان IP، mg/kg ۱۰ تک دوز، دریافت کردند. گروه های تجربی شماره ۱، ۲، ۳ کروسین را به ترتیب با دوزهای mg/kg/day, IP۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ به همراه بوسولفان IP، mg/kg ۱۰ تک دوز دریافت نمودند. گروه کنترل مثبت فقط کروسین با دوز mg/kg/day, IP ۴۰۰ دریافت نمود. پس از پایان دوره درمان حیوانات به وسیله دوز بالای کتامین آسان کشی شدند. تخمدان های چپ جهت مطالعه ریز سنجی بافتی مورد نمونه برداری قرار گرفتند. داده های حاصله با استفاده از نرم افزار SPSS و روش آماری ANOVA یک طرفه و تست تعقیبی Bonferroni مورد مقایسه قرار گرفتند و اختلاف ها در سطح $P<0.05$ معنی دار توصیف گردیدند.

یافته های پژوهش: در این مطالعه مشخص شد که خاصیت آنتی اکسیدانتی کروسین قادر است استرس اکسیداتیو القاء شده توسط بوسولفان را خنثی نموده و موجب رشد بیشتر فولیکول های تخمدانی سالم و کاهش میانگین تعداد فولیکول های آترتیک در مقایسه با گروه دریافت کننده بوسولفان گردد. ضمناً، این مطالعه نشان داد که اثر کروسین وابسته به دوز بوده و در اغلب پارامترها با دوز mg/kg ۲۰۰ دارای اثر بهتری بود.

بحث و نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان داد که کروسین قادر است به طور قابل توجهی از عوارض جانبی مخرب بوسولفان در رشد فولیکول های تخمدانی را بکاهد.

واژه های کلیدی: کروسین، بوسولفان، هیستومورفومتری، تخمدان، موش سفید کوچک آزمایشگاهی

* نویسنده مسئول: گروه علوم پایه، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

Email: r.shahrooz@urmia.ac.ir

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.35]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 7:00 IRST on Saturday January 16th 2021

مقدمه

سرطان به عنوان یکی از علل اصلی مرگ و میر در جهان به شمار می رود که حتی در کشورهای توسعه یافته هم به طور گسترده قابل مشاهده می باشد. شیمی درمانی روش متداول درمان سرطان می باشد، ولی وجود بعضی از محدودیت ها در تاثیر شیمی درمانی باعث می شود نتیجه ناموفقی از شیمی درمانی به دست آید(۱). درمان های مدرن دارویی برای سرطان های مختلف در بدن شناخته شده اند که عوارض جانبی آن ها آسیب های قابل توجهی به اعضای مختلف بدن مخصوصاً دستگاه تناسلی وارد می سازد. وظیفه اصلی تخمدان تولید سلول های جنسی ماده می باشد که مصرف بوسولفان باعث نقص عملکرد تخمدان می گردد(۲). بوسولفان از داروهای آلکیله کننده بوده و یک دی متان سولفانات می باشد که در شیمی درمانی به طور گسترده مورد استفاده قرار می گیرد(۳). بوسولفان هم چنین جزء داروهای سیتوتوکسیک بوده و وقتی هیدرولیز می شود گروه های متان سولفونات آزاد می کند و این متان سولفونات نهایتاً به اسید متان سولفونیک و تتراهیدروفوران تبدیل می شود که باعث آلکیله شدن DNA شده و از همانندسازی DNA و ترجمه RNA ممانعت می کند(۴،۵). آلکیله شدن DNA باعث Cross Linking هم می گردد و در نهایت از تکثیر سلول های سرطانی جلوگیری کرده و نیز باعث آپوپتوز سلول ها از طریق مسیر P53 می گردد(۶،۷). در مجموع داروهای شیمی درمانی از قبیل بوسولفان با القای صدمات فولیکولی و آترزی شدن فولیکول ها(۸) باعث کاهش جمعیت فولیکولی و کیفیت فولیکول ها می گردد. در مطالعات انجام شده تزریق بوسولفان در موش ها باعث کاهش قابل توجه تعداد فولیکول های تخمدانی و تاخیر در بلوغ فولیکول های آنترال موش ها و نیز باعث کم شدن اندازه تخمدان می گردد(۷). از علل اصلی آترزی فولیکول های تخمدانی، آپوپتوز در سلول های گرانولوزای فولیکول های تخمدانی است که به وسیله داروهای شیمی درمانی از جمله بوسولفان اتفاق می افتد، که در این زمینه فولیکول های آنترال بیشتر از بقیه حساس می باشند(۹).

عدم تعادل بین آنتی اکسیدانت ها و اکسیدانت ها در بدن باعث ایجاد استرس اکسیداتیو می گردد که برای کاهش اثرات استرس اکسیداتیو بایستی از آنتی اکسیدانت ها استفاده کرد. در سال های اخیر تحقیقات نشان داده که ترکیبات گیاهی می توانند به عنوان داروهای موثری به عنوان آنتی اکسیدان مورد استفاده قرار بگیرند(۱۲-۱۰).

کلاله گل زعفران شامل مواد شیمیایی متنوعی می باشد(۱۳). کروسین Crocin موجود در زعفران به عنوان کاروتنوئید گلیکوزیله با تاثیر متنوع فارماکولوژیکی می باشد که از جمله این تاثیرات می توان حفاظت سلول های عضله قلبی در آسیب های هیپوکسی(۱۴) و خاصیت حفاظتی آنتی اکسیدانتی روی سلول های سرطانی(۱۵،۱۶) و خاصیت ضد افسردگی(۱۷،۱۸) و خاصیت ضدالتهابی(۱۹) را نام برد. هم چنین مطالعات نشان داده کروسین دارای ترکیبات Caretenoid Crocin و Monoterpen aldehydes و Picrocrocin و Safranal می باشد(۲۰). لذا مطالعه حاضر با هدف تعیین اثرات محافظتی کروسین بر عوارض سوء درمان با بوسولفان بر رشد طبیعی فولیکول های تخمدان و آترزی آن ها انجام گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه ۳۰ سر موش سوری نژاد NMRI بالغ سالم با سن ۸ هفته با وزن ۲۵-۲۲ گرم از شرکت مد زیست سامانه پیشرو تهران تهیه گردید و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ساعت تاریکی در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی گراد و رطوبت ۶۰-۳۰ درصد نگهداری شدند و محدودیتی از نظر دسترسی به آب و غذا نداشتند.

موش ها به طور تصادفی به ۶ گروه ۵ تایی تقسیم شدند.

گروه کنترل، حلال BSF(بوسولفان) را شامل حجم برابر DMSO و PBS (۰/۱ میلی لیتر به صورت داخل صفاقی) تک دوز دریافت نمود.

گروه کنترل شم، BSF را با دوز ۱۰ mg/kg, IP به صورت تک دوز دریافت نمود.

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.35]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 7:00 IRST on Saturday January 16th 2021

گروه های تجربی شماره ۱، ۲ و ۳ به ترتیب کروسین را با دوزهای IP، mg/kg/day ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ همراه با BSF با دز IP، mg/kg ۱۰ به صورت تک دوز دریافت نمودند.

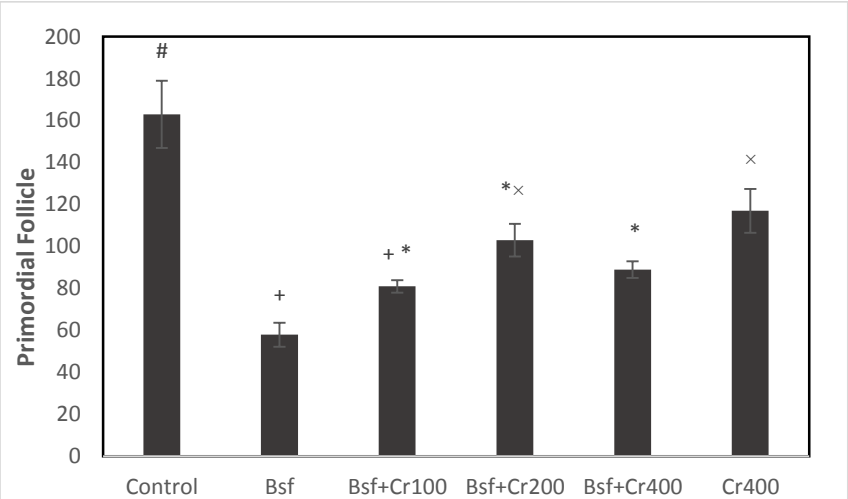
گروه کنترل مثبت فقط کروسین با دوز mg/kg/day ۴۰۰ به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند.

بعد از ۲۱ روز تیمار، موش ها به وسیله کتامین ۱۰ درصد(محصول انستیتو پاستور ایران) به میزان mg/kg ۷۵ و زایلازین ۲ درصد(محصول انستیتو پاستور ایران) به میزان mg/kg ۳ بی هوش شده و سپس با دز بالای داروی بی هوشی کتامین(mg/kg ۱۸۰) آسان کشی شدند و تخمدان های چپ جهت مطالعه بافت شناسی در محلول ثبوتی(فرمالین بافری ۱۰ درصد) قرار داده شدند و پس از اطمینان از ثبوت بافتی، با پارافین قالب گیری شده و در مرحله بعدی توسط میکروتوم از بافت های تخمدانی مقاطع سریالی به ضخامت ۷-۵ میکرومتر تهیه و پس از رنگ آمیزی با روش هماتوکسیلین-ائوزین فولیکول های تخمدانی در مراحل مختلف رشد شامل مقدماتی، اولیه، ثانویه، ثالث و گراف مورش شمارش قرار گرفتند. هم چنین فولیکول های آترتیک به دو شکل پیش آنترال و آنترال شمارش شدند.

داده های حاصله با استفاده از نرم افزار SPSS vol.16 و روش آماری ANOVA یک طرفه و تست تعقیبی Bonferroni مورد مقایسه آماری قرار گرفتند و اختلاف بین گروه ها در سطح $P<0.05$ معنی دار توصیف گردید و تمامی داده ها با میانگین و معیار خطا نشان داده شدند.

یافته های پژوهش

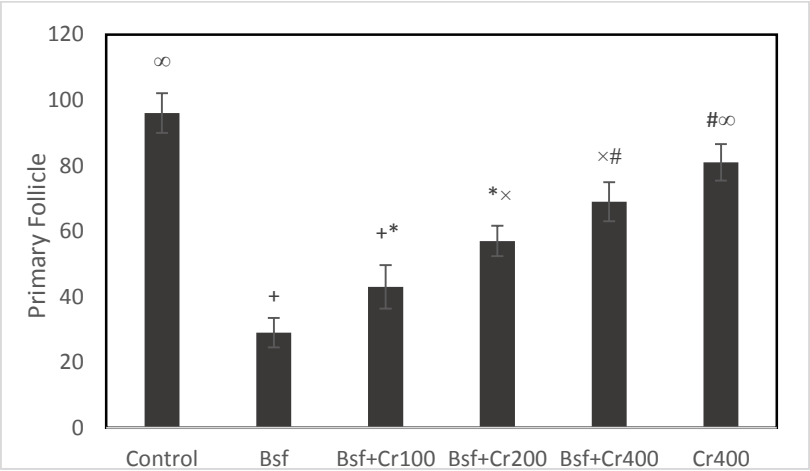
نتایج ریز سنجی فولیکول های مختلف تخمدانی نشان داد که میانگین تعداد فولیکول های مقدماتی در گروه های دریافت کننده بوسولفان همراه با کروسین mg/kg ۴۰۰ و۲۰۰ و ۱۰۰ نسبت به گروه بوسولفان افزایش داشت که این افزایش در گروه های دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین mg/kg ۴۰۰ و ۲۰۰ دارای اختلاف معنی داری بود($P<0.05$). گروه های دریافت کننده بوسولفان همراه با کروسین mg/kg ۴۰۰ و ۲۰۰ و ۱۰۰ نسبت به گروه کنترل کاهش نشان دادند که این کاهش دارای اختلاف آماری معنی داری بود($P<0.05$). هم چنین نشان داده شد که گروه کروسین mg/kg ۴۰۰ نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف معنی دار بود($P<0.05$)(نمودار شماره ۱)(تصاویر شماره ۱-C).



نمودار شماره ۱. مقایسه میانگین تعداد فولیکول های مقدماتی در گروه های مختلف(Mean±Se)
علامت های نامشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح $P<0.05$ می باشد.

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.35]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 7:00 IRST on Saturday January 16th 2021

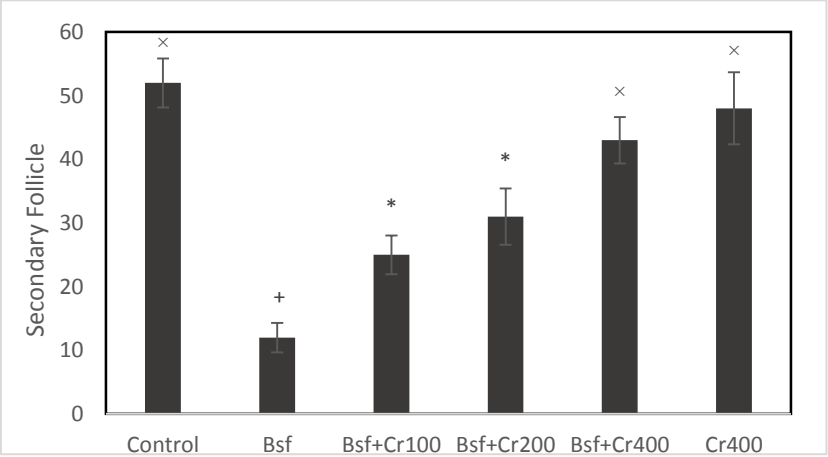
ارزیابی نتایج فولیکول های تخمدانی اولیه نشان داد که میانگین تعداد این فولیکول ها در گروه های دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین ۴۰۰ mg/kg و ۲۰۰ نسبت به گروه دریافت کننده بوسولفان افزایش معنی دار داشت($P<0.05$)، ولی گروه دریافت کننده بوسولفان همراه با کروسین ۱۰۰ mg/kg نسبت به گروه دریافت کننده بوسولفان فاقد افزایش معنی داری بود. هم چنین مشخص گردید هر سه گروه دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین ۴۰۰ mg/kg و ۲۰۰ و ۱۰۰ نسبت به گروه کنترل دارای کاهش با اختلاف معنی داری بودند($P<0.05$). گروه دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین ۴۰۰ mg/kg با گروه دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین با دز ۲۰۰ mg/kg اختلاف معنی داری نداشت ولی نسبت به گروه دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین ۱۰۰ mg/kg دارای افزایش با اختلاف معنی دار بود($P<0.05$). هم چنین نشان داده شد که گروه دریافت کننده کروسین ۴۰۰ mg/kg نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف معنی داری نبود(نمودار شماره ۲)(تصاویر شماره ۱-A).



نمودار شماره ۲. مقایسه میانگین تعداد فولیکول های اولیه در گروه های مختلف(Mean±Se)
علامت های نامشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح $P<0.05$ می باشد.

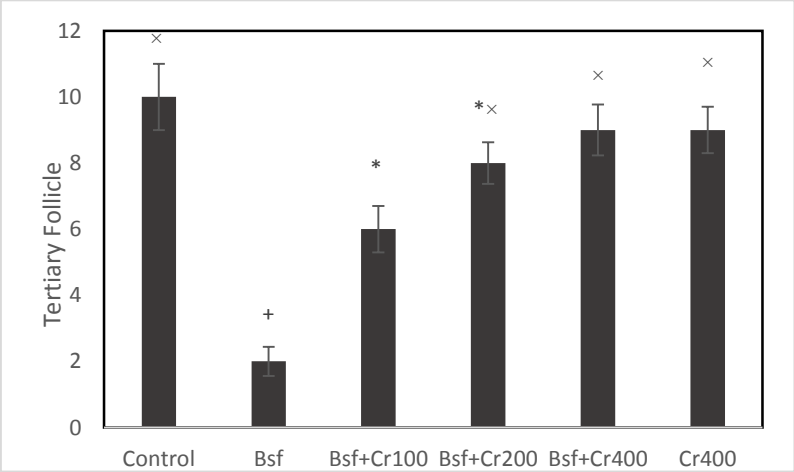
نتایج مطالعه حاضر مشخص نمود که میانگین تعداد فولیکول های ثانویه در گروه های دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین ۴۰۰ mg/kg و ۲۰۰ و ۱۰۰ نسبت به گروه دریافت کننده بوسولفان دارای افزایش معنی داری بودند($P<0.05$)، در حالی که نسبت به گروه کنترل فقط گروه دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین ۴۰۰ mg/kg فاقد اختلاف معنی دار بود. هم چنین نشان داده شد که میانگین تعداد فولیکول های ثانویه در گروه دریافت کننده کروسین ۴۰۰ mg/kg با گروه کنترل اختلاف معنی داری نداشت(نمودار شماره ۳)(تصاویر شماره ۱-F).

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.35]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 7:00 IRST on Saturday January 16th 2021



نمودار شماره ۳. مقایسه میانگین تعداد فولیکول های ثانویه در گروه های مختلف(Mean±Se)
علامت های نامشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح P<0.05 می باشد.

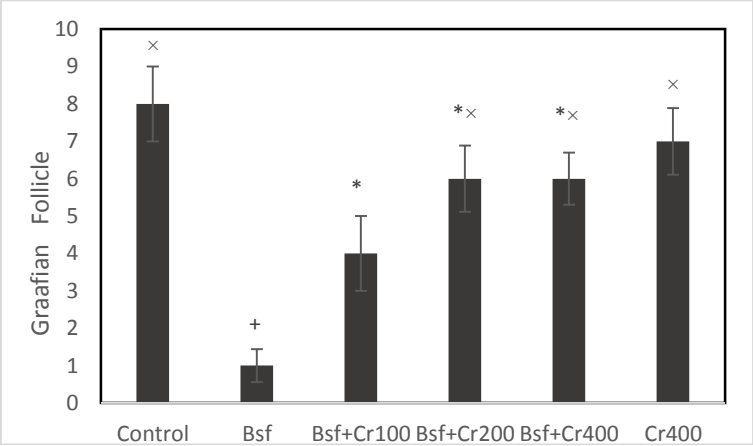
مطالعه حاضر نشان داد که میانگین تعداد فولیکول‌های ثالث در گروه دریافت‌کننده بوسولفان به همراه کروسین ۴۰۰ mg/kg و ۲۰۰ و ۱۰۰ نسبت به گروه دریافت کننده بوسولفان دارای افزایش معنی داری بود(P<0.05) و گروه دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین ۴۰۰ mg/kg و ۲۰۰ نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری نداشت ولی گروه دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین ۱۰۰ mg/kg نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان داد. گروه دریافت کننده کروسین ۴۰۰ mg/kg نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف معنی داری نبود(نمودار شماره ۴) (تصاویر شماره ۱-A).



نمودار شماره ۴. مقایسه میانگین تعداد فولیکول های ثالث در گروه های مختلف(Mean±Se)
علامت های نامشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح P<0.05 می باشد.

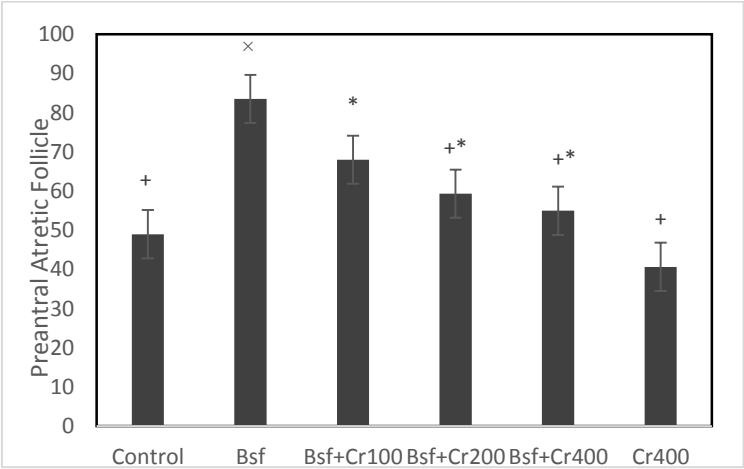
این مطالعه نشان داد میانگین تعداد فولیکول های گراف در گروه های دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین ۴۰۰ mg/kg و ۲۰۰ و ۱۰۰ نسبت به گروه دریافت کننده بوسولفان افزایش پیدا کرده که دارای اختلاف معنی داری بودند و در گروه های دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین فقط گروه دریافت کننده بوسولفان با کروسین ۱۰۰ mg/kg نسبت به گروه کنترل دارای کاهش با اختلاف معنی داری بود(P<0.05)، و هر سه گروه دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین فاقد اختلاف معنی داری با یکدیگر بودند. گروه دریافت کننده کروسین ۴۰۰ mg/kg با گروه کنترل فاقد اختلاف معنی داری بود(نمودار شماره ۵)(تصاویر شماره ۱-D).

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.35]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 7:00 IRST on Saturday January 16th 2021



نمودار شماره ۵. مقایسه میانگین تعداد فولیکول های گراف در گروه های مختلف(Mean±Se)
علامت های نامشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح P<0.05 می باشد.

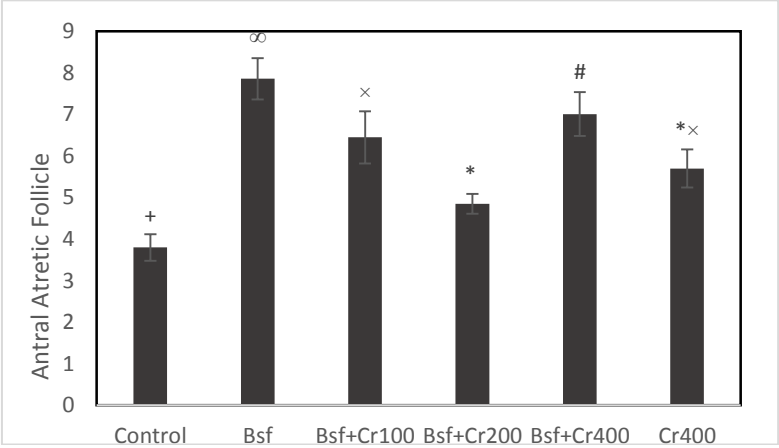
مطالعه حاضر نشان داد که میانگین تعداد فولیکول های آترتیک پیش آنترال در گروه های دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین ۴۰۰ mg/kg و ۲۰۰ و ۱۰۰ نسبت به گروه دریافت کننده بوسولفان دارای کاهش معنی داری بودند و این اختلاف نسبت به گروه کنترل فقط در گروه دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین ۱۰۰ mg/kg افزایش معنی دار نشان داد(P<0.05). هم چنین هر سه گروه دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین ۴۰۰ mg/kg و ۲۰۰ و ۱۰۰ نسبت به هم اختلاف معنی داری نداشتند. گروه دریافت کننده کروسین ۴۰۰ mg/kg نسبت به گروه کنترل فاقد اختلاف معنی داری بود(نمودار شماره ۶)(تصاویر شماره ۱-E).



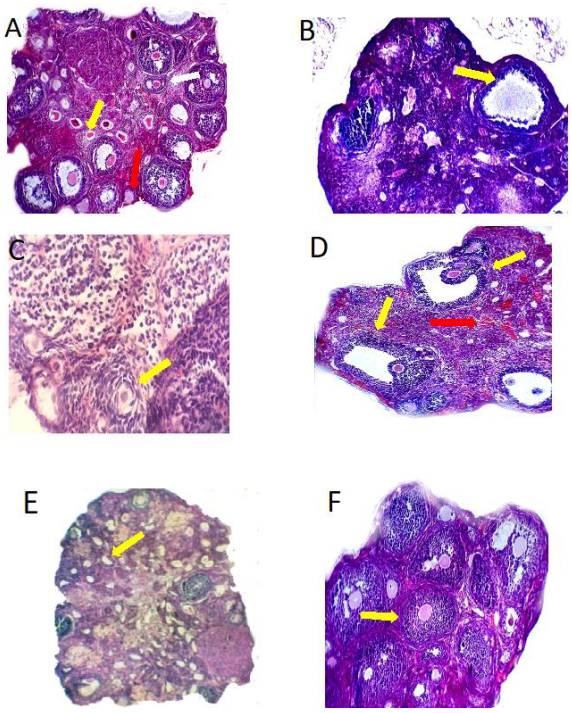
نمودار شماره ۶. مقایسه میانگین تعداد فولیکول های آترتیک پیش آنترال در گروه های مختلف(Mean±Se)
علامت های نامشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح P<0.05 می باشد.

این مطالعه نشان داد که میانگین تعداد فولیکول های آترتیک آنترال در گروه های دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین ۴۰۰ mg/kg و ۲۰۰ و ۱۰۰ نسبت به گروه دریافت کننده بوسولفان کاهش پیدا کرده بود و این کاهش دارای اختلاف معنی داری بود و هم چنین هر سه گروه دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین ۴۰۰ mg/kg و ۲۰۰ و ۱۰۰ نسبت به گروه کنترل نیز دارای افزایش با اختلاف معنی دار بودند و نیز هر سه گروه دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین ۴۰۰ mg/kg و ۲۰۰ و ۱۰۰ نسبت به هم اختلاف معنی دار نشان دادند و هم چنین گروه دریافت کننده کروسین ۴۰۰ mg/kg نسبت به گروه کنترل دارای افزایش با اختلاف معنی داری بود(P<0.05)(نمودار شماره ۷)(تصاویر شماره ۱-B).

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.35]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 7:00 IRST on Saturday January 16th 2021



نمودار شماره ۷. مقایسه میانگین تعداد فولیکول های آترتیک آنترال در گروه های مختلف(Mean±Se) علامت های نامشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح P<0.05 می باشد.



تصاویر شماره ۱. برش عرضی تخمدان ها در گروه های مختلف آزمایشی، تصویر A: گروه کنترل، که پیکان زرد فولیکول مقدماتی، پیکان قرمز فولیکول اولیه، پیکان سفید فولیکول ثالث را نشان می دهند. تصویر B: گروه کنترل شم، که پیکان زرد فولیکول آترتیک آنترال را نشان می دهد. تصویر C: گروه بوسولفان به همراه کروسین ۱۰۰ mg/kg/day، که پیکان زرد فولیکول مقدماتی را نشان می دهد. تصویر D: گروه بوسولفان به همراه کروسین ۲۰۰ mg/kg/day، که پیکان های زرد فولیکول های گراف و پیکان قرمز عروق خونی را نشان می دهند. تصویر E: گروه بوسولفان به همراه کروسین ۴۰۰ mg/kg/day، که پیکان زرد فولیکول آترتیک پیش آنترال را نشان می دهد. تصویر F: گروه کروسین ۴۰۰ mg/kg/day، که پیکان زرد فولیکول ثانویه را نشان می دهد(رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت نمائی ۱۰۰x).

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه مشخص شد که استفاده از بوسولفان در شیمی درمانی موجب کاهش جمعت فولیکول های مقدماتی، اولیه، ثانویه، ثالث و گراف نسبت به گروه کنترل گردید، در حالی که استفاده از کروسین با دزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.35]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 7:00 IRST on Saturday January 16th 2021

بدن به همراه بوسولفان موجب افزایش فولیکول های در حال رشد نسبت به گروه بوسولفان شد که در اغلب موارد با گروه کنترل دارای اختلاف معنی دار بود($P<0.05$). بر اســـــاس گزارشات قبلی داروهای سایتوتوکسیک آسیب های برگشت ناپذیری بر روی غدد جنسی می گذارند(۲۱) و اغلب آنتی اکسیدانت ها دارای اثرات محافظتی بوده و تنش های اکسیداتیو و اثرات منفی اکسیدانت ها را تعدیل می بخشند(۲۲). در جنس ماده کاهش تنش اکسیداتیو می تواند به صورت بالقوه تخریب ناشی از ROS را کاهش داده(۲۳) و در نتیجه باعث حفظ تعداد و کیفیت اووسیت و فولیکول گردد(۲۴). مطالعات گذشته نشان داده اند که تجمع ROS در سلول می تواند منجر به اختلال در عملکرد سیستم آنتی اکسیدانتی و آپوپتوز گردد(۲۵). یافته ها ثابت کرده که سلول های مختلف حساسیت های متـــفاوتی نسبـــت به داروهای شیمی درمانی نشان می دهند. سلول های گرانولوزای فولیکول های در حال رشد، سلول های فعال از نظر تقسیم میتوز بوده ولی اووســـیت ها در مراحل پایانی رشـــد فولیکول و تخمک گذاری به عنوان سلول در حال تقسیم محسوب می شوند. هم چنین تایید شده سلول های سوماتیک تخمدانی که از لحاظ میتوزی فعال هستند، بیشتر مورد تهاجم داروهای شیمی درمانی قرار می گیرند ولی اووسیت ها که در مرحله دیکتیوتن تقسیم میوز متوقف شده اند و در درون فولیکول های نابالغ در حال رشد قرار دارند، کمتر تحت تاثیر داروهای شیمی درمانی قرار می گیرند(۲۶). البته مطالعات ثابت کرده سلول های گرانولوزا در همه فولیکول های پیش آنترال و آنترال به سرعت دچار نابودی می گردند که به احتمال زیاد ناشی از اســـترس اکسیداتیو و شکستن پیوندهای DNA می باشد(۲۷). هم چنیـــــن مطالعات نشان داده گنادوتروپین ها و استروژن ها از فاکتورهای بقاء برای سلول های فولیکولی هستند. در حقیقت فولیکول هایی که نسبت آندروژن به استروژن بالا داشته باشند، به آپوپتوز حساسترند. استروژن ها باعث رشد فولیکولی و آندروژن ها آترزی فولیکولی را القاء می کننـــــد(۱۶). چنان چه فولیکول های بزرگ تر و حفره دار دچار آترزی شوند، علائم تخریب از سلول های دانه دار شروع شده و بعداً قسمت های دیگر را درگیر می کند. در سلـــــول هـــــای دانه دار، هسته پیکنوزه شده و سلول های گرانولوزا از غشاء پایه جدا می شوند و گسیختگی بین آن ها ایجاد می گردد و ورقه بازال سوراخ شده و در نهایت ماکروفاژها در فولیکول ها ظاهر می شوند(۲۸)، ولی اگر فولیکول های کوچک تر دچار آترزی شوند، در ابتدا اووسیت چروکیده شده و فاگوسیته می گردد(۲۹).

آترزی فولیکول های پیش آنترال غیر وابسته به گنادوتروپین ها بوده و مستقل از محور هیپوتالاموسی -هیپوفیزی- گنادی می باشد و بر عکس آترزی فولیکول های آنترال وابسته به گنادوتروپین ها بوده و متاثر از محـــــور هیپوتالاموسی-هیپوفیزی- گنادی می باشد. مطالعات حاضر نشان داد بوسولفان و کروسین به هر دو فولیکول های آنترال و پیش آنترال تاثیر می گذارند، بنا بر این هورمون های گنادوتروپین هیچ تاثیری در عملکرد این داروها نداشته و بوسولفان و کروسین در هر مرحله از رشد فولیکول ها می توانند تاثیر داشته باشند.

در مطالعه حاضر ارزیابی فولیکول های آترتیک پیش آنترال و آنترال مشخص کرد که بوسولفان جمعیت فولیکول های آترتیک را افزایش داده و با گروه کنترل دارای اختلاف معنی داری بود($P<0.05$). در حالی که کروسین با هر سه دز ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به همراه بوسولفان جمعیت فولیکول های آترتیک را کاهش داد که با گروه بوســـــولفان دارای اختلاف معنی دار بود($P<0.05$). هم چنین مشاهده شد که کروسین با دز ۴۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در رابطه با فولیکول های آترتیک آنترال دارای عملکرد بهتری بود.

رادیکال های آزاد با اکسید نمودن و آسیب رسانی به ساختار اسید نوکلئیک تخمک و فولیکول های در حال رشـــــد در تخمدان از رشد فولیکولی جلوگیری می کنند(۳۰). از این نکته به خوبی مشخص گردیده است که کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانتی بافت های مختلف به ویژه تخمدان و افزایش تنش اکسیداتیو باعث تشدید و القاء آترزی در سطح فولیکول های

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.35]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 7:00 IRST on Saturday January 16th 2021

آنترال می گردد که این مسئله به نوبه خود میزان تخمک گذاری را به میزان زیادی کاهش می دهد.

گونه های فعال اکسیژن(Reactive Oxygen Species) در شروع آپوپتوز به وسیله مواد سمی مختلف در فولیکول های آنترال و سلول های گرانولوزا نقش دارند. بنا بر این هر ماده ای که بتواند ROS را در بافت تخمدانی افزایش دهد موجبات اختلال رشد فولیکولی و تخمک را فراهم خواهد آورد، در نتیجه به منظور کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از داروهای شیمی درمانی می‌توان از عناصر آنتی اکسیدانتی استفاده کرد، چون باعث برقراری تعادل در میزان رادیکال های آزاد می گردند. نهایتاً کاهش تنش اکسیداتیو می تواند به صورت بالقوه تخریب ناشی از ROS را کاهش داده و باعث حفظ کیفیت و کمیت فولیکول ها گردد.

نتایج حاصل از این تحقیق ثابت نمود بوسولفان به عنوان یک عامل دخالت کننده در آسیب های وارده به اووسیت و سلول های گرانولوزا می باشد و کروسین هم به عنوان یک دارو یا آنتی اکسیدانت با منشاء گیاهی با یک الگوی وابسته به دز می تواند آسیب های وارده توسط بوسولفان را کاهش دهد.

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه مشخص گردید بوسولفان موجب کاهش شدید جمعیت همه رده های فولیکولی و افزایش آترزی در آن ها می گردد. در بررسی کمی جمعیت فولیکولی مشخص گردید که به کار گیری کروسین در یک الگوی وابسته به دز موجب کاهش معنی دار تخریب فولیکولی در مقایسه با گروه دریافت کننده بوسولفان می شود. بیشترین نجات فولیکولی در اکثر موارد در گروهی که کروسین ۴۰۰ mg/kg/day دریافت کرده بودند مشاهده گردید که نشان دهنده خاصیت آنتی اکسیدانی کروسین در دز بالا بود. لذا برای کاهش اثرات مخرب بوسولفان، از کروسین به عنوان داروی با منشاء گیاهی همراه با بوسولفان استفاده گردید. کروسین می تواند روند فولیکولوژنز را بهبود بخشیده و از افزایش تعداد فولیکول های آترتیک جلوگیری نماید. بنا بر این، استفاده از کروسین همزمان با شیمی درمانی امکان حفظ باروری پس از دوره شیمی درمانی را فراهم می آورد.

سپاسگزاری

این مقاله بر اساس دستورالعمل کار با حیوانات آزمایشگاهی کمیته اخلاقی دانشگاه ارومیه با کد اخلاقی AECVU-192-2019، از پایان نامه دکتری تخصصی به شماره ثبت ۶-۱۸۳۰-۶۴۰ استخراج شده و با مساعدت های بی دریغ کارکنان آزمایشگاه بافت شناسی و جنین شناسی و معاونت پژوهشی محترم دانشکده دام پزشکی دانشگاه ارومیه به انجام رسیده است که از ایشان صمیمانه تقدیر و تشکر می گردد.

References

1. Mitchison D. How drug resistance emerges as a result of poor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis. Int J Tub Lung Dis1998; 2: 510-27. doi: iuatld/ijtld/1998/00000002/00000001/art00005

2. Familiari G, Caggiati A, Nottola SA, Ermini M, Benedetto MR, Motta PM. Ultrastructure of human ovarian primordial follicles after combination chemotherapy for Hodgkins disease. Hum Rep1993; 8: 2080-87. doi: org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137985

3. Vaskivuo T. Regulation of apoptosis in the female reproductive system. Oulu Yliop 2002; 951: 661-7. doi: 10.1093/humupd/dmr039

4. Chandra K, Salman AS, Mohd A, Sweety R, Ali KN. Protection against FCA induced oxidative stress induced DNA damage as a model of arthritis and In vitro anti-arthritic potential of costus speciosus rhizome extract. Int J Pharm Phyt Res 2015; 7: 383. doi: 383. 8a12/44f01e72743a806b0354e9d924dfb8fd0479

5. Probin V, Wang Y, Bai A, Zhou D. Busulfan selectively induces senescence but not apoptosis in w138 fibroblasts via a p53-independent but extracellular signal-regulated kinasep38 mitogen-activated protein kinase dependent mechanism. J

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.35]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 7:00 IRST on Saturday January 16th 2021

Pharmacol Exp Ther 2006; 319: 551-600. doi: org/10.1124/jpet.106.107771
6. Rogalska A, Marczak A, Gajek A. Induction of apoptosis in human ovarian cancer cells by new anticancer compounds epothilone A and B. Toxicol Invitro 2013; 27: 239-49. doi: org/10.1016/j.tiv.2012.09.006
7. Pelloux MC, Picon R, Gangnerau MN, Darmoul D. Effects of Busulfan on ovarian folliculogenesis steroidogenesis and anti mullerian activity of rat neonates. Acta Endocrinol Copenh 1988; 118: 206-18. doi: org/10. 1530/acta.0.1180218
8. Iwamoto T, Hiraku Y, Oikawa S, Mizutani H, Kojima M, Kawanishi S. DNA intrastrand cross inj at the 5-GA-3 sequence formed by busulfan and its role its role in the cytotoxic effect. Cancer Sci 2004; 95: 454-58. doi: org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03231.x
9. Patrick J, Devine S, Perreault D, Ulrike L. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. Biol Rep 2012; 86: 2. doi: org/10.1095/biolreprod.111.095224
10. Agarwal A, Durairajanayagam DS, Plesis U. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques an evidence based review. Rep Biol Endocrinol 2014; 12: 112. doi: org/10.1186/1477-7827-12-112
11. Bemis DLCJ, Costello JE, Vorys GC, Katz AE, Buttyan R. The use of herbal and over-the counter dietary supplements for the prevention of prostate. Curr Urol Rep2006; 7: 74-166. doi: article/10.1007/s11918-006-0016-x
12. Giovannini P, Howes MR, Edwards SE. Medicinal plants used in the traditional management of diabetes and its sequelae in Central America a review. J Ethnopharmacol 2016; 184: 58-71. doi: org/10.1016/j.jep.2016.02.034
13. Abdullaev FI, Riveronnegrete L, Caballero H, Manuel J, PerezLopez I, Pereda R, et al. Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron Crocus sativus. Toxicol Invitro 2003;17: 7316. doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00098-5
14. Kim SH, Lee JM, Kim SC, Park CB, Lee PC. Proposed cytotoxic mechanisms of the saffron carotenoids crocin and cancer cell lines. Bioch Cell Biol2014; 92: 105-33. doi: abs/10.1139/bcb-2013-0091
15. Alessandro AM, Mancini A, Lizzi AR, De Simone A, Marroccella CE, Gravina GL, et al. Crocus sativus stigma extract and its major constituent crocin possess significant antiproliferative properties against human prostate cancer. Nutr Cancer2013; 65: 930-40. doi:10.1080/01635581.2013.767368
16. Wu Y, Pan R, Geng P. The effect of crocin against hypoxia damage of myocardial cell and its mechanism. Chinese J Appl Physiol 2010; 26: 453-57. doi: org/abstract/med/21328986
17. Pohanka M. Alzheimers disease and oxidative stress: a review. Curr Med Chem 2014; 21: 356-64. doi: 10.1021/bk-2015-1200.ch001
18. Wang Y, Han T, Zhu Y, Zheng CJ, Ming QL, Ranman K, et al. Antidepressant properties of bioactive fraction from the extract of Crous sativus. J Nat Med2010; 64: 24-30. doi: org/abstract/med/25769424
19, Nam KN, Park YM, Jung HJ, Lee JY, Min BD, Park SU, et al. Anti-inflammatory effects of crocin and crocetin in rat brain microglial cells. Eur J Pharmacol 2010; 648: 6-110. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.09.003
20. Salomi MJ, Nair SC, Panikkar KR. Inhibitory effects of Nigella sative and saffron Crocus sativus on chemical carcinogenesis in Mice. Nutr Cancer 1991; 16: 67-73. doi:10.1080/01635589109514142
21. Oktay K, Kan MT, Rosenwaks Z . Recent progress in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation. Curr Opin Obstet Gynecol 2001;13: 263-68. doi: info:mpMuZf7bDiQJ
22. Hanukoglu, I. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. Drug Metab Rev 2006; 38:171-96. doi: abs/10.1080/03602530600570040
23. Yang Y, Karakhanova S, Werner J, Bazhin AV. Reactive oxygen species in cancer biology and anticancer therapy. Curr Med Chem 2013; 20: 3677-92. doi: JUiEpbMe1x0J
24. Sadowska I, Bartosz G. Effect of antioxidants supplementation on aging and

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.35]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 7:00 IRST on Saturday January 16th 2021

longevity. Biomed Res Int 2014; 17: 21-2. doi: org/10.1155/2014/404680
25. Janda J, Nfonsam V, Calienes F, Sligh JE, Jandova J. Modulation of ROS levels in fibroblasts by altering mitochondria regulates the process of wound healing. Arch Dermatol Res 2016; 308: 239-48. doi: org/10.1007/s0040
26. Cohen G, Riahi Y, Sunda V, Deplano S, Chatgilialoglu CH, Ferreri C, et al. Signaling properties of 4 hydroxyalkenals formed by lipid peroxidation in diabetes. Free Rad Biol Med 2013; 65: 978-87. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.163
27. Bedaiwy MA, Rizk B. Fertility preservation advances and controversies role of reactive oxygen species. Fert Ste 2014; 82: 593-600. doi: C7EiAwAAQBAJ&oi
28. Tripathi A, Chaube SK. Reduction of phosphorylated Thr-161 Cdk1 level participates in roscovitine-induced Fas ligand mediated apoptosis in Rat eggs cultured in vitro. Invitro Cell Dev Biol Anim 2015; 51: 174-82. doi: org/10.1007/s11626-014-9812-8
29. Stone KD, Prussin C, Metcalfe D. IgE, mast cells, basophils, and osinophils. J Allerg Clin Immunol 2010; 125: 73-80. doi: 10.2147/JAA.S121092
30. Saki F, Beigi M, Sadoughi MA, Adeli OA. [The effect of low 7.5 mg/kg of Asprin on ovary tissue during implantation period in Mice]. Yafte 2012; 14: 85-90. (Persian) doi: yafte.lums.ac.ir/article81 -fa.

[DOI: 10.29252/sjimu.27.4.35]

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 7:00 IRST on Saturday January 16th 2021

Protective Effect of Crocin on Histomorphometry Growth and Atresia of Ovarian Follicles among Laboratory Rats treated with Busulfan

Hassanzadehkhanmiri H[1], Shahrooz R[1], Hassanzadeh S[1], Najafi G[1]*

(Received: April 13, 2019 Accepted: August 26, 2019)

Abstract

Introduction: Busulfan-related oxidative stress reduces fertility; therefore, this study aimed to investigate the protective role of crocin on ovarian histological changes.

Materials & Methods: This study was conducted on 30 adult NMRI rats weighing 22-25 g in 6 equal groups in a 21-day period. The control group received a single dose (0.1 ml) of busulfan solvent (DMSO+PBS) intraperitoneally (IP) and the sham control group were subjected to a single dose of IP busulfan (10 mg/kg). Moreover, the experimental groups of 1, 2, and 3 received crocin intraperitoneally with doses of 100, 200, 400 mg/kg/day, respectively along with a single dose of busulfan (10 mg/kg). The positive control group received only crocin intraperitoneally at a dose of 400 mg/kg/day. After the end of the treatment period, animals were euthanized with a high-dose of ketamine. Left ovaries were used for the histomorphometric study. The data were analyzed using SPSS software (version19) through a one-way ANOVA and Bonferroni test. A P-value less than 0.05 were considered statistically significant. *Ethics code:* AECVU-192-2019

Findings: This study showed that the antioxidant properties of crocin could neutralize the busulfan-related oxidative stress which resulted in the growth of more healthy ovarian follicles and reduced the mean number of Atretic follicles, compared to the group received busulfan. Moreover, this study revealed dose-depended effects of crocin which indicated a significant benefit on the majority of parameters with a dose of 200 mg/kg.

Discussion & Conclusions: The present study showed the remarkable ability of crocin in reducing the adverse effects of busulfan on the growth of ovarian follicles.

Keywords: Busulfan, Crocin, Histomorphometry, Laboratory rat, Ovary

1. Dept of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
** Corresponding author Email: r.shahrooz@urmia.ac.ir*