

تأثیر محافظتی اتیل پيروات بر رشد و آترزی فولیکول‌های تخمدان موش‌های سوری تحت درمان با سیکلوفسفامید

فهیمة خان محمدی قانع^{۱*}، رسول شهروز^۲، عباس احمدی^۳، مزدک رازی^۴

چکیده

زمینه و هدف: عوارض جانبی حاصل از سیکلوفسفامید باعث کاهش باروری و حتی ناباروری در افراد تحت درمان با این دارو می‌شود. در این پژوهش، نقش محافظتی اتیل پيروات بر تغییرات بافت تخمدان، متعاقب شیمی درمانی با سیکلوفسفامید مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۱۵ سر موش سوری ماده ۸-۶ هفته‌ای به ۳ گروه تقسیم شدند. به گروه کنترل، روزانه سرم فیزیولوژی (IP، ۰/۱ میلی‌لیتر)، به گروه کنترل شم، سیکلوفسفامید یک‌بار در هفته (IP، ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و به گروه تجربی، سیکلوفسفامید به همان روش به همراه تزریق روزانه اتیل پيروات (IP، ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تجویز شد. در روز بیست و یکم پس از پایان دوره درمان، میزان SOD (Superoxide Dismutase)، TAOC (Total Antioxidant) و استروژن سرم و میزان MDA (Malondialdehyde) در تخمدان چپ اندازه‌گیری شد. از تخمدان راست جهت مطالعات بافت‌شناسی و ریخت‌سنجی استفاده گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی انجام گرفت. سطح معنی‌داری، $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در گروه کنترل شم، کاهش معنی‌داری در تعداد انواع فولیکول‌های تخمدان طبیعی، تعداد جسم زرد، میزان TAOC، SOD و استروژن، همچنین افزایش معنی‌داری در تعداد فولیکول‌های آترتیک پیش‌آنترال، تعداد ماست‌سل‌ها و میزان MDA در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید ($p < 0/05$). تجویز اتیل پيروات به‌طور معنی‌دار دارای اثر محافظتی در پارامترهای یادشده در مقایسه با گروه کنترل شم بود ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: طبق نتایج این مطالعه، تجویز اتیل پيروات می‌تواند به میزان قابل توجهی از عوارض سوء ناشی از تجویز سیکلوفسفامید بر بافت تخمدان جلوگیری کند.

کلید واژه‌ها: ریخت‌سنجی؛ تخمدان؛ فولیکول تخمدان؛ آترزی؛ سیکلوفسفامید؛ اتیل پيروات؛ موش.

^۱کارشناس ارشد بافت‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۲دانشیار آناتومی و علوم تشریح، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۳استادیار آناتومی و علوم تشریح، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۴استادیار بافت‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

فهیمة خان محمدی قانع، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

fahimekh685@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۲۲

تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۱۷

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Khanmohammadi Ghane F, Shahrouz R, Ahmadi A, Razi M. The protective effect of ethyl pyruvate on growth and atresia of ovarian follicles in cyclophosphamide-treated mice. Qom Univ Med Sci J 2015;9(3):1-11. [Full Text in Persian]

مقدمه

در معالجه انواع سرطان‌ها، از داروها و روش‌های درمانی متعددی استفاده می‌شود. سیکلوفسفامید به‌طور گسترده در درمان سرطان‌ها، بیماری‌های خودایمن و بیماری‌های خونی جهت افزایش طول عمر بیماران مورد استفاده قرار می‌گیرد. سیکلوفسفامید با وجود ایجاد بهبودی در بیماران سرطانی، اختلالاتی را در تخمدان ایجاد می‌کند. مهم‌ترین عمل تخمدان تولید سلول‌های جنسی ماده است. تعداد تخمک‌هایی که در پستانداران تولید می‌شود بسیار محدود است. این سلول‌ها در پستانداران از جمله در انسان، فقط در دوران جنینی تکثیر می‌یابند و پس از تولد تعداد مشخص و محدودی فولیکول به‌صورت ذخیره در تخمدان وجود دارد که تخلیه این فولیکول‌ها منجر به پیری زودرس تخمدان می‌شود (۱). ثابت شده است معالجه سرطان با استفاده از سیکلوفسفامید در بیماران سرطانی جنس ماده، موجب نقص در عملکرد تخمدان می‌شود (۲). مواد آلکیل‌کننده از جمله سیکلوفسفامید، باعث موتاسیون ژنی، شکست کروموزومی و آنپلوئیدی در سلول‌های سوماتیک می‌شود (۳). همچنین سیکلوفسفامید موجب نابودی فولیکول‌های مقدماتی شده و به‌علت کاهش ذخیره فولیکولی، تأثیر منفی روی سیستم تولیدمثلی دارد که در نتیجه، ناباروری و یائسگی زودرس در جنس ماده را به همراه خواهد داشت (۴). استرس اکسیداتیو در نتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در مقابل ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول ایجاد می‌شود که منجر به تولید انواع رادیکال‌های آزاد شامل آنیون سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال هیدروکسیل (OH) و مشتقات غیررادیکالی از اکسیژن مانند هیدروژن پراکسید (H_2O_2) می‌شود. این رادیکال‌های آزاد به‌شدت ناپایدار بوده و به‌طور سریع و غیراختصاصی با مولکول‌های زیستی واکنش نشان می‌دهند که منجر به ایجاد و گسترش انواع آسیب‌های سلولی از جمله پراکسیداسیون غشای پلاسمایی، اکسیداسیون اسیدهای آمینه و نوکلئیک، آپوپتوز و نکروز می‌شود (۵-۷). از آنجایی که داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی به عنوان عامل تولیدکننده استرس اکسیداتیو در بدن عمل کرده و سطح تولید رادیکال‌های آزاد در بدن را افزایش می‌دهند، لذا به‌نظر می‌رسد از طریق این مکانیسم، سیکلوفسفامید

اثرات سوء خود را بر دستگاه‌های بدن و سیستم تولیدمثلی اعمال می‌کند، که از آن جمله کاهش پتانسیل باروری است. بنابراین، پزشکان و متخصصان برای حفظ توان باروری بیماران تحت شیمی‌درمانی می‌توانند از عوامل آنتی‌اکسیدانی به همراه شیمی‌درمانی، به‌منظور کاهش اثرات سوءاسترس اکسیداتیو و کاهش سطح رادیکال‌های آزاد تولیدشده در بدن استفاده کنند. لذا جهت تعدیل یا جلوگیری از اثرات استرس اکسیداتیو ایجادشده به‌وسیله سیکلوفسفامید، آیا عاملی نظیر اتیل پیرووات که دارای نقش آنتی‌اکسیدانی است می‌تواند مفید واقع شود؟ پیرووات دارای نقش میانجی متابولیسم بوده و یک متابولیت نهایی از چرخه گلیکولیز است و سوبسترای چرخه اسید کربوکسیلیک (Tricarboxilic acid, TCA) می‌باشد (۸).

همچنین پیرووات برای از بین بردن گونه‌های اکسیژن واکنش‌دهنده ROS (Reactive Oxygen Species) در سلول (۹-۱۱) عمل کرده و یک عامل ضدالتهاب است (۱۲-۱۴). استفاده از پیرووات به‌عنوان دارو به دلیل ناپایدار بودن، محدود است. اتیل پیرووات از ترکیب اسید پیرویک و اتانول حاصل می‌شود (۱۵). اتیل پیرووات میزان زنده ماندن را بیشتر کرده و در درمان اختلالات ناشی از شوک هموراژیک (۱۶)، مسمومیت (۱۷)، پانکراتیت (۱۸) و ضربه‌ها (۱۹) مؤثر است. علاوه بر آن، اتیل پیرووات دارای اثرات محافظتی بر روی اعصاب در برابر مسمومیت با پاراکوات (۲۰) و آسیب ایسکمی طناب نخاعی (۲۱) می‌باشد. از آنجایی که تا به حال مطالعه‌ای در زمینه تأثیر اتیل پیرووات به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت در کاهش اثرات استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز سیکلوفسفامید بر روی رشد و آترزی فولیکول‌های تخمدانی صورت نگرفته است، این مطالعه با هدف تعیین تأثیر محافظتی اتیل پیرووات بر روند رشد و آترزی فولیکول‌های تخمدانی در موش‌های تحت درمان با سیکلوفسفامید انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی از ۱۵ سر موش سوری نژاد NMRI ماده بارور ۸-۶ هفته‌ای استفاده شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به ۳ گروه تقسیم شدند:

۱- گروه کنترل که روزانه به آنها سرم فیزیولوژی به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر به‌طور داخل صفاقی تزریق شد؛ ۲- گروه کنترل شم که سیکلوفسفامید را جهت ایجاد استرس اکسیداتیو یک‌بار در هفته به میزان ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌طور داخل صفاقی دریافت کردند؛ ۳- گروه تجربی که سیکلوفسفامید را به روش گروه کنترل شم به همراه تزریق روزانه اتیل پیرووات به میزان ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌طور داخل صفاقی دریافت کردند. گروه‌ها به مدت ۲۱ روز تیمار شدند.

حیوانات در شرایط استاندارد (دمای 22 ± 2 درجه سانتیگراد، رطوبت ۶۰-۳۰٪ و دوره نوری، ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی) نگهداری شدند و به آب و غذای کافی به‌صورت آزاد دسترسی داشتند.

پس از پایان دوره درمان، از خون و بافت تخمدان حیوانات نمونه‌برداری شد. جهت بیهوشی نسبی برای خونگیری، از روش قطع ورید وداجی از کتامین به میزان ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌طور داخل صفاقی و برای آسان‌کشی حیوانات از دوز چهار برابر (مقدار لازم برای بی‌حسی) داروی کتامین استفاده شد. در ادامه، سرم نمونه‌های خونی پس از سانتریفوژ (دور ۳۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه) جدا و در داخل میکروتیوپ استریل ریخته شد و تا زمان آنالیز آنزیمی و هورمونی در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس با بازکردن محوطه بطنی حیوانات، نمونه‌برداری از تخمدان راست، جهت مطالعات بافت‌شناسی و ریخت‌سنجی انجام گرفت. نمونه‌های برداشته‌شده پس از ثبوت در محلول فرمالین بافری ۱۰٪ (به مدت ۴۸ ساعت) و عبور از مراحل پاساژ بافتی، قالب‌گیری، برش سریال و رنگ‌آمیزی مقاطع تهیه‌شده با هماتوکسیلین - ائوزین؛ از نظر میزان رشد فولیکول‌های تخمدانی در گروه کنترل و دو گروه تحت درمان مورد بررسی قرار گرفتند.

مطالعه بافت‌شناسی تخمدان جهت بررسی شکل ظاهری فولیکول‌ها، پراکندگی ماست سل‌ها (رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو) و مطالعه ریخت‌سنجی تخمدان‌ها با شمارش تعداد فولیکول‌ها در مراحل مختلف رشد، آترتیک و تعداد جسم زرد انجام شد.

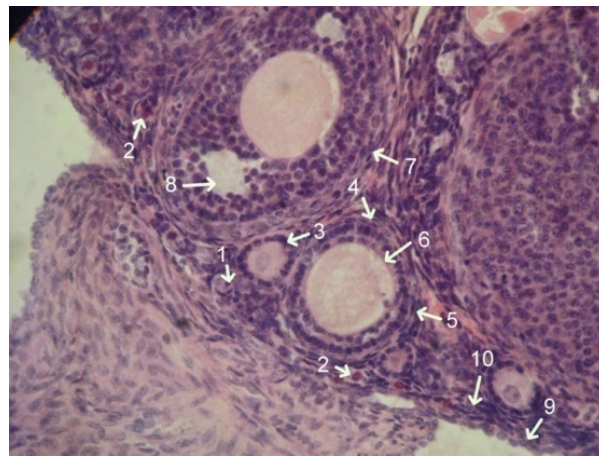
تخمدان‌های چپ نیز به‌منظور اندازه‌گیری مقادیر مالون دی‌آلدئید در بافت تخمدان برداشته شدند و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. نمونه‌های سرمی نگهداری‌شده در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد، جهت اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم (TAOC)، میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) سرم و اندازه‌گیری هورمون استروژن مورد استفاده قرار گرفت.

برای اندازه‌گیری SOD از کیت Ransod به روش رنگ‌سنجی (RANDOX Laboratories Ltd., 55 Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim, United Kingdom, BT29 4QY, SD125) و برای اندازه‌گیری TAOC از روش بنزی استفاده شد (۲۲). هورمون استروژن با استفاده از روش RIA (Radioimmunoassay) و کیت اختصاصی (England, Immunometric-Estradiol-Ria-Rka1205) برحسب پیکوگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد.

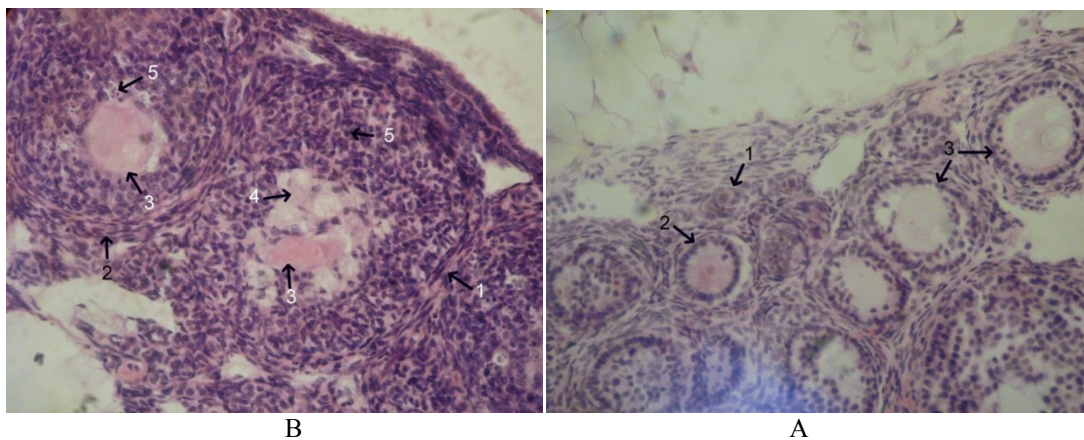
جهت تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدی، مقدار تولید MDA در بافت تخمدان‌های چپ برداشته‌شده با استفاده از واکنش اسید تیوباریتوریک (TBA) اندازه‌گیری شد (۲۳). مقدار مالون دی‌آلدئید براساس نانومول در هر میلی‌گرم پروتئین از نمونه‌ها محاسبه گردید (۲۴). میزان پروتئین نمونه‌ها براساس روش لوری (lowry) (۲۵) و برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS، آزمون واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی انجام گرفت. سطح معنی‌داری، ($p < 0.05$) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

فولیکول‌های در حال رشد و آترزی در تخمدان حیوانات گروه کنترل همانند سایر گروه‌ها مشاهده گردید که فقط در مطالعه ریخت‌سنجی تخمدان، تفاوت وجود داشت، لذا بررسی بافت‌شناسی ظاهری تخمدان در بین گروه‌های مورد بررسی تفاوت مشخصی را نشان نداد (شکل شماره ۱ و ۲).



شکل شماره ۱: برش از تخمدان راست (گروه کنترل) شامل: ۱- فولیکول مقدماتی؛ ۲- فولیکول مقدماتی آترتیک (تغییر رنگ پذیری هسته)؛ ۳- فولیکول اولیه؛ ۴- فولیکول ثانویه؛ ۵- لایه تکی؛ ۶- زونا بلوسیدا؛ ۷- فولیکول ثالث؛ ۸- حفره آنتروم؛ ۹- اپی تلیوم سطحی تخمدان؛ ۱۰- تونیکا آلبوژینه (رنگ آمیزی H&E، درشتنمایی ۴۰۰x).



شکل شماره ۲: برش از تخمدان راست (گروه کنترل شم) شامل: A-۱: فولیکول مقدماتی؛ ۲- فولیکول اولیه آترتیک (پدیدارشدن واکوئل‌های متعدد در سیتوپلاسم اووسیت، جدا شدن سلول‌های گرانولوزا از لایه بازال)؛ ۳- فولیکول ثانویه آترتیک (پدیدارشدن واکوئل‌های متعدد در داخل سیتوپلاسم اووسیت، تشکیل آنتروم زودرس، از بین رفتن انسجام سلول‌های گرانولوزا)؛

B-۱: فولیکول ثالث آترتیک (از بین رفتن لایه بازال سلول‌های گرانولوزا و نفوذ رگهای خونی در بین سلول‌های گرانولوزا، چروکیدگی و تغییر شکل اووسیت، ریزش سلول‌های گرانولوزا به داخل حفره آنتروم)؛ ۲- فولیکول ثانویه آترتیک (چروکیدگی و تغییر شکل اووسیت، از بین رفتن لایه بازال سلول‌های گرانولوزا و از هم گسیختگی آنها، پیکنوزده شدن هسته سلول‌های گرانولوزا)؛ ۳- اووسیت؛ ۴- حفره آنتروم؛ ۵- هسته پیکنوزده شده سلول‌های گرانولوزا، (رنگ آمیزی H&E، درشتنمایی ۴۰۰x).

میانگین تعداد فولیکول‌های آنترال آترتیک با تجویز سیکلوفسفامید در گروه کنترل شم در مقایسه با گروه کنترل، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$) و تجویز اتیل پیرووات سبب کاهش میانگین تعداد فولیکول‌های آنترال آترتیک شد، اما این کاهش در مقایسه با گروه کنترل شم فاقد اختلاف معنی‌دار بود (جدول شماره ۱ و ۲).

در نتایج ریخت‌سنجی فولیکول‌های تخمدان، با تجویز سیکلوفسفامید در گروه کنترل شم، کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد فولیکول‌های طبیعی، میانگین تعداد جسم زرد و افزایش معنی‌داری در میانگین تعداد فولیکول‌های آترتیک نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0.05$) (جدول شماره ۱ و ۲). تجویز اتیل پیرووات به‌طور معنی‌دار، میانگین تعداد فولیکول‌های طبیعی و تعداد جسم زرد را افزایش و تعداد فولیکول‌های پیش‌آنترال آترتیک را نسبت به گروه کنترل شم کاهش داد ($p < 0.05$).

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین تعداد فولیکول‌های طبیعی و جسم زرد در تخمدان‌های راست گروه‌های مورد مطالعه

گروه	کنترل	کنترل شم	تجربی
فولیکول طبیعی			
مقدماتی	270.6 ± 3.41	229.6 ± 3.32	277.2 ± 2.35
اولیه	18.2 ± 0.58	6.2 ± 0.58	16.8 ± 0.48
ثانویه	14.4 ± 0.74	2.2 ± 0.37	16.4 ± 0.5
ثالثیه	7.0 ± 0.44	2.2 ± 0.2	6.6 ± 0.67
گراف	8.6 ± 0.6	4.6 ± 0.6	7.2 ± 0.48
جسم زرد	16 ± 1	4.0 ± 0.57	10.33 ± 0.32

اعداد با حروف نامشابه در هر ردیف، نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ بین گروه‌ها می‌باشد.

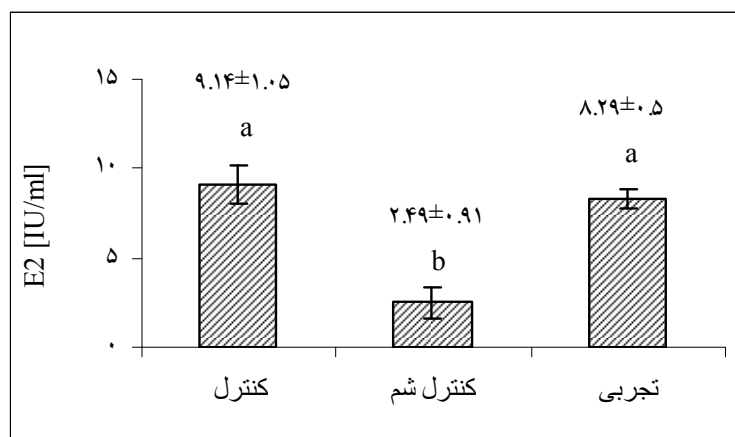
جدول شماره ۲: مقایسه میانگین تعداد فولیکول‌های آنریک در تخمدان‌های راست گروه‌های مورد مطالعه

گروه	کنترل	کنترل شم	تجربی
فولیکول آنریک			
مقدماتی	197.2 ± 3.87	327.6 ± 3.18	132.4 ± 0.92
اولیه	29.8 ± 0.66	45.4 ± 1.43	21.4 ± 0.67
ثانویه	78.8 ± 1.35	84.8 ± 1.85	65.6 ± 0.92
ثالثیه	25.2 ± 1.39	45 ± 1.3	42.6 ± 1.46
گراف	0.6 ± 0.24	1.8 ± 0.37	1.4 ± 0.24

اعداد با حروف نامشابه در هر ردیف، نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ بین گروه‌ها می‌باشد.

استروژن را تا حد گروه کنترل افزایش دهد که با گروه کنترل شم دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p < 0.05$) (نمودار شماره ۱).

در نتایج اندازه‌گیری میزان استروژن سرم؛ در گروه کنترل شم، کاهش معنی‌داری در سطح این هورمون در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید و تجویز اتیل پیروات توانست سطح سرمی

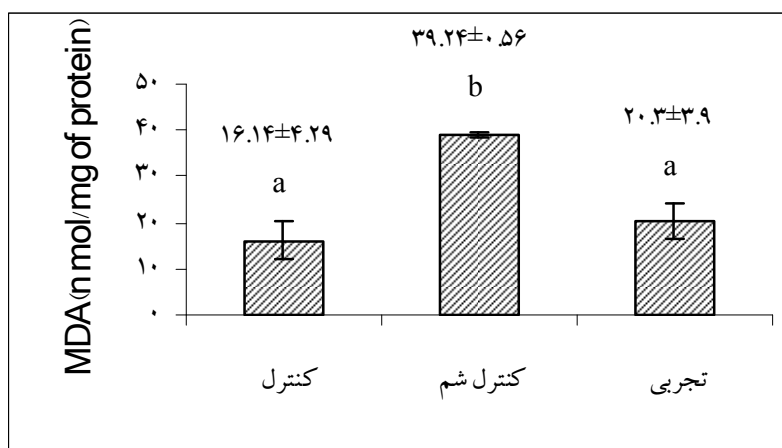


نمودار شماره ۱: مقایسه میانگین میزان هورمون استروژن سرم

ستون‌ها با حروف نامشابه (a,b)، نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ بین گروه‌ها می‌باشد.

به عنوان یک آنتی اکسیدانت توانست میزان MDA در بافت تخمدان را به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل شم و تا حد گروه کنترل کاهش دهد ($p < 0.05$) (نمودار شماره ۲).

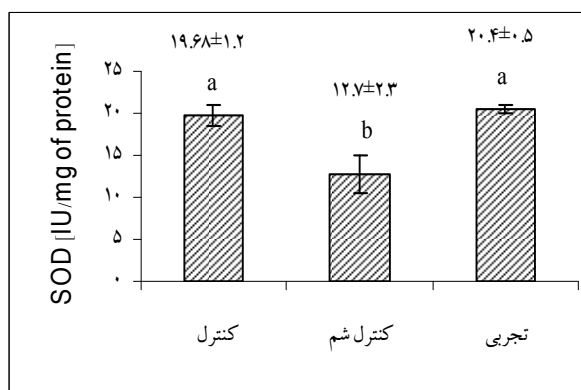
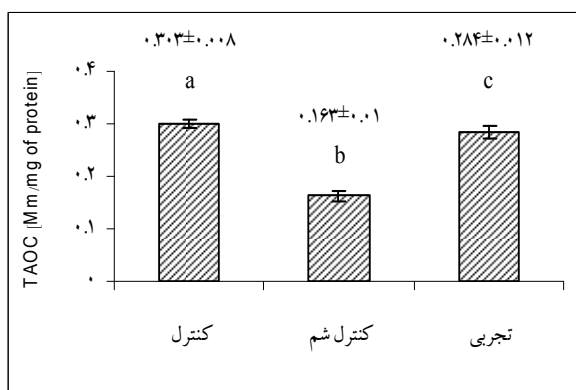
در نتایج اندازه گیری مقادیر مالون دی آلدئید (MDA) در بافت تخمدان، افزایش معنی داری در میزان MDA در گروه کنترل شم در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید و تجویز اتیل پیرووات



نمودار شماره ۲: مقایسه میانگین مقادیر MDA در تخمدان های چپ ستون ها با حروف نامشابه (a,b)، نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در سطح $p < 0.05$ بین گروه ها می باشد.

همچنین تجویز اتیل پیرووات، میزان TAOC و SOD را تا حد گروه کنترل افزایش داد که با گروه کنترل شم دارای اختلاف معنی داری بود ($p < 0.05$) (نمودارهای شماره ۳ و ۴).

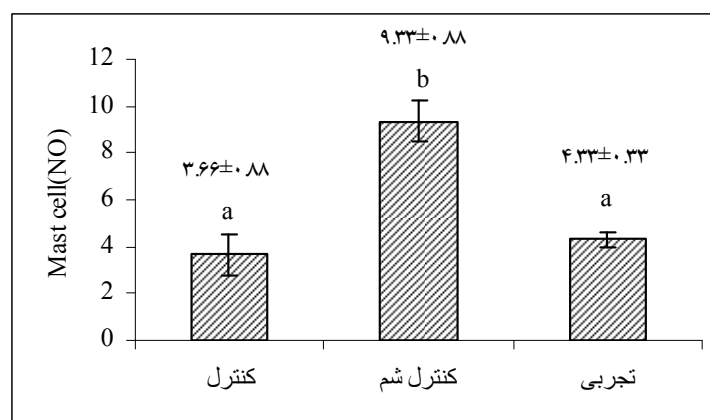
در نتایج اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام (TAOC) آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) سرم مشخص گردید میزان TAOC و SOD در گروه کنترل شم در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری یافته است.



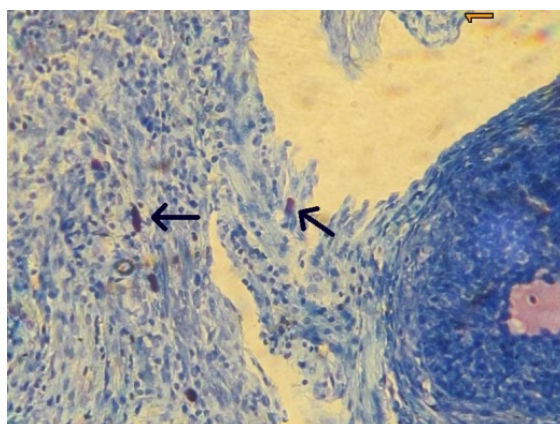
نمودار شماره ۳ و ۴: مقایسه میانگین میزان SOD و TAOC سرم ستون ها با حروف نامشابه (a,b)، نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در سطح $p < 0.05$ بین گروه ها می باشد.

همچنین تجویز اتیل پیرووات، میانگین تعداد ماست سل ها در گروه تجربی را در مقایسه با گروه کنترل شم، به طور معنی داری کاهش داد ($p < 0.05$) (نمودار شماره ۵).

در شمارش تعداد ماست سل های تخمدان های راست گروه کنترل شم، افزایش معنی داری در میانگین تعداد ماست سل ها در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید (شکل شماره ۳).



نمودار شماره ۵: مقایسه میانگین تعداد ماست سل‌ها در تخمدان‌های راست ستون‌ها با حروف نامشابه (a,b)، نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ بین گروه‌ها می‌باشد.



شکل شماره ۳: برش از تخمدان راست (گروه کنترل شم)، فلش‌ها نشان‌دهنده ماست سل‌ها در بافت همبند مدولای تخمدان می‌باشند، (رنگ آمیزی تولوئیدین بلو، درشتنمایی $400\times$).

بحث

کنترل شم گردید ($p < 0.05$). تزریق سیکلوفسفامید به موش‌های سوری ماده، اساساً بر فولیکول‌های مقدماتی تأثیر داشته و سایر شاخصه‌های تخمدانی از قبیل تخمک‌گذاری، انتقال تخمک و تنظیمات نورواندوکروینی را نیز مختل می‌کند (۲۶). در مطالعه حاضر سیکلوفسفامید سبب کاهش تخمک‌گذاری و میانگین تعداد جسم زرد در گروه کنترل شم در مقایسه با گروه کنترل گردید ($p < 0.05$). با توجه به اثر سیکلوفسفامید بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیزی-گنادی (۲۷) و اینکه رشد فولیکول‌های آنترال تحت تأثیر هورمون‌های این محور می‌باشد (۲۸)، در این مطالعه اتیل پیروات نتوانست از اثرات استرس اکسیداتیو حاصل از سیکلوفسفامید بر روی این فولیکول‌ها بکاهد و در نتیجه میانگین تعداد فولیکول‌های آنترال آترتیک در گروه تجربی فاقد اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل شم بود.

در این مطالعه با ایجاد استرس اکسیداتیو بر روی دستگاه تناسلی از طریق تجویز سیکلوفسفامید، کاهش معنی‌داری در میانگین انواع فولیکول‌های طبیعی تخمدان، تعداد جسم زرد، سطح سرمی استروژن، TAOC و SOD و افزایش معنی‌داری در میانگین تعداد انواع فولیکول‌های آترتیک، ماست سل‌ها و میزان MDA بافت تخمدان، در گروه کنترل شم در مقایسه با گروه کنترل دیده شد که این مشاهدات، بیانگر اثر سمی سیکلوفسفامید بر فعالیت تولیدمثلی از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو بود، همچنین با تجویز همزمان اتیل پیروات به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت، این اثر سمی دارو تخفیف یافت و سبب افزایش معنی‌دار میانگین تعداد فولیکول‌های طبیعی، سطح سرمی استروژن، TAOC، SOD و کاهش معنی‌دار میانگین تعداد فولیکول‌های پیش آنترال آترتیک، ماست سل‌ها و میزان MDA در بافت تخمدان در مقایسه با گروه

رشد فولیکول‌های پیش‌آنترال، مستقل از محور هیپوتالاموس-هیپوفیزی-گنادی می‌باشد (۲۸). در مطالعه حاضر اثر محافظتی اتیل پیروات بر روی فولیکول‌های پیش‌آنترال واضح‌تر بود و اتیل پیروات توانست به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل شم این نوع فولیکول‌ها را از آترزی شدن محافظت کند ($p < 0.05$). Das نیز در مطالعه خود با بررسی نقش محافظتی اسید اسکوریک به عنوان آنتی‌اکسیدانت بر اثرات توکسیک سیکلوفسفامید روی اختلالات آندروژنیک و گامتوژنیک تخمدان در رت‌ها نشان داد سیکلوفسفامید به‌طور معنی‌داری از فعالیت پراکسیداز و کاتالاز جلوگیری کرده و سطح مالون دی‌آلدئید را بالا می‌برد که تمامی این تغییرات با درمان به‌وسیله اسید اسکوریک و به‌طور همزمان با سیکلوفسفامید معکوس شد (۲۹). در مطالعه حاضر سیکلوفسفامید سبب افزایش معنی‌دار میزان مالون دی‌آلدئید در بافت تخمدان گروه کنترل شم در مقایسه با گروه کنترل شد و استفاده از اتیل پیروات به عنوان آنتی‌اکسیدانت و محافظ اثرات ثانویه سیکلوفسفامید توانست میزان MDA را در حد گروه کنترل پایین نگه داشته و دستگاه تناسلی را از آسیب‌های ناشی از افزایش رادیکال‌های آزاد محافظت کند. نقش محافظتی ویتامین E در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز سیکلوفسفامید در موش‌های سوری به اثبات رسیده است. این عمل ویتامین E ممکن است در نتیجه تخریب رادیکال‌های آزاد، همچنین تحریک آزادسازی گنادوتروپین‌های لوب قدامی هیپوفیز باشد (۳۰). عصاره هیدروالکلی زنجبیل نیز می‌تواند عوارض فارماکولوژیک داروی سیکلوفسفامید بر روی عملکرد محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گنادی را مهار کند (۲۷). با توجه به اینکه سلول‌های فولیکولی به عنوان منبع استرادیول در بافت تخمدان محسوب می‌شوند (۳۱)، هرگونه اختلال و آسیب جدی در این سلول‌ها باعث کاهش معنی‌دار سطح استرادیول سرمی می‌شود (۳۲). در مطالعه حاضر نیز استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز سیکلوفسفامید موجب کاهش شدید استرادیول نسبت به گروه کنترل شد ($p < 0.05$)، درحالی‌که در گروه دریافت‌کننده اتیل پیروات به همراه سیکلوفسفامید، این اثر سیکلوفسفامید خنثی گردید.

با توجه به اینکه سیکلوفسفامید، آترزی فولیکولی را در سطح معنی‌داری افزایش می‌دهد، بنابراین، دور از انتظار نیست که به دلیل آسیب وارده به سلول‌های گرانولوزا، تولید استرادیول کاهش یابد. همچنین سیکلوفسفامید با تخلیه مخازن گلوکوکورتیکوئیدهای گرانولوزا، در آپوپتوز سلول‌های گرانولوزای COV434 انسانی نقش دارد (۳۳). نکته‌ای که می‌بایست به آن توجه شود خطوط دفاعی آنتی‌اکسیدانتی بافت‌های مختلف، همچون بافت تخمدان در برابر استرس‌های اکسیداتیو است. بافت‌ها عموماً به‌وسیله دو مکانیسم متفاوت مانند سیستم آنتی‌اکسیدانتی آنزیمی و غیر آنزیمی در برابر رادیکال‌های آزاد واکنش نشان می‌دهند. در سیستم آنزیمی؛ گلوکوکورتیکوئیدها، سوپراکسید دیسموتازها و کاتالاز مهم‌ترین نقش را دارا هستند. اما به هر حال، برآیند عملکرد دو سیستم دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی، توان یا ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی بافت تخمدان را نشان می‌دهد (۳۴). بنابراین، در تحقیق حاضر سعی گردید میزان سرمی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به عنوان یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های دخیل در ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی مورد ارزیابی قرار گیرد. مشاهدات نشان داده است در موش‌های درمان‌شده با سیکلوفسفامید به تنهایی، سطح سرمی آنزیم مذکور، همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام سرم در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ کاهش می‌یابد. این در حالی است که در این مطالعه تجویز اتیل پیروات سطح سرمی این آنزیم و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام سرم نسبت به گروه کنترل شم، به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد ($p < 0.05$).

ماست‌سل‌ها در حیوانات به تغییرات سطح هورمون‌ها حساس هستند (۳۵). توزیع ماست‌سل‌ها در تخمدان موش صحرایی به برخی از تغییرات فیزیولوژیک در طول سیکل جنسی وابسته است (۳۶). آزاد شدن هیستامین و فاکتورهای کموتاکتیک در پاسخ به استرس‌های حاد فیزیکی و شیمیایی به‌وسیله ماست‌سل‌های دگرانوله‌شده، منجر به افزایش نفوذپذیری عروق خونی و فراخوانی سلول‌های ایمنی می‌گردد (۳۷). از طرفی، مطالعات نشان داده‌اند افزایش تعداد ماست‌سل‌ها با ناباروری در ارتباط است (۳۸).

سیستم تولیدمثلی را از آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو ایجادشده به‌وسیله سیکلوفسفامید که اغلب موجب ناباروری می‌شود، محافظت کند، به‌طوری‌که در مطالعه حاضر اتیل پیرووات توانست در افزایش کیفیت فولیکول‌های تخمدانی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی سرم، کاهش آترزی فولیکولی، کاهش واکنش‌های عروقی، التهابات بافتی و میزان MDA در بافت تخمدان مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه تشکر و قدردانی می‌گردد.

در نتیجه، افزایش میانگین تعداد ماست سل‌ها در گروه کنترل شم و کاهش معنی‌دار آن در گروه دریافت‌کننده اتیل پیرووات تا حد کنترل می‌تواند نقش آنتی‌اکسیدانتی اتیل پیرووات را در کاهش واکنش‌های عروقی و التهابات بافتی نشان دهد ($p < 0.05$)، همچنین میانگین تعداد این سلول‌ها در ارتباط با تغییرات هورمونی ایجادشده به‌وسیله سیکلوفسفامید می‌تواند افزایش یابد.

نتیجه‌گیری

با در نظر گرفتن تمامی نتایج به دست آمده به‌همراه تفسیر آنها، مطالعه حاضر این ایده را تقویت می‌کند که سمیت تولیدمثلی ناشی از تجویز سیکلوفسفامید، به‌واسطه استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد و یک آنتی‌اکسیدانت قوی مانند اتیل پیرووات می‌تواند

References:

1. Vaskivuo T. Regulation of apoptosis in the female reproductive system. Oulu Yliopist 2002;951(42):6661-7.
2. Himelestein-Braw R, Peters H, Farber M. Morphological study of the ovaries of leukaemic children. Br J Cancer 1978;38(1):82-7.
3. Ben-Yehuda D, Krichevsky S, Caspi O, Rund D, Polliack A, Abeliovich D, et al. Microsatellite instability and p53 mutations in therapy-related leukemia suggest mutator phenotype. Blood 1996;88(11):4296-303.
4. Apperley JF, Reddy N. Mechanism and management of treatment-related gonadal failure in precipitants of high dose chemotherapy. Blood Rev 1995;9:93-116.
5. Abdoon AS, Kandil OM, Otoi T, Suzuki T. Influence of oocyte quality culture media and gonadotropins on cleavage rate and development of in vitro fertilized buffalo embryos. Animal Repro Sci 2001;65(3-4):215-23.
6. Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum Reprod Update 2001;7(2):175-89.
7. Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants from chemical to biochemical mechanisms. Food Chem Toxicol 1999;37(9-10):949-62.
8. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. Science 2009;324(5930):1029-33.
9. Wang X, Perez E, Liu R, Yan LJ, Mallet RT, Yang SH. Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. Brain Res 2007;1132(1):1-9.
10. Hinoi E, Takarada T, Tsuchihashi Y, Fujimori S, Moriguchi N, Wang L, et al. A molecular mechanism of pyruvate protection against cytotoxicity of reactive oxygen species in osteoblasts. Mol Pharmacol 2006;70(3):925-35.
11. Jagtap JC, Chandele A, Chopde B, Shastry P. Sodium pyruvate protects against H₂O₂ mediated apoptosis in human neuroblastoma cell line-SK-NMC. J Chem Neuroanat 2003;26(2):109-18.
12. Wang Q, van Hoecke M, Tang XN, Lee H, Zheng Z, Swanson RA, et al. Pyruvate protects against experimental stroke via an anti-inflammatory mechanism. Neurobiol Dis 2009;36(1):223-31.

13. Das UN. Pyruvate is an endogenous anti-inflammatory and anti-oxidant molecule. *Med Sci Monit* 2006;12(5):79-84.
14. Gupta SK, Rastogi S, Prakash J, Joshi S, Gupta YK, Awor L, et al. Antiinflammatory activity of sodium pyruvate a physiological antioxidant. *Indian J Physiol Pharmacol* 2000;44(1):101-4.
15. Fink MP. Ethyl pyruvate: A novel treatment for sepsis. *Curr Drug Targets* 2007;8(4):515-18.
16. Cai B, Brunner M, Wang H, Wang P, Deitch EA, Ulloa L. Ethyl pyruvate improves survival in awake hemorrhage. *J Mol Med* 2009;87(4):423-33.
17. Andersson A, Fenhammar J, Frithiof R, Sollevi A, Hjelmqvist H. Haemodynamic and metabolic effects of resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate in the acute phase of porcine endotoxaemic shock. *Acta Anaesthesiol Scand* 2006;50(10):1198-1206.
18. Cheng BQ, Liu CT, Li WJ, Fan W, Zhong N, Zhang Y, et al. Ethyl pyruvate improves survival and ameliorates distant organ injury in rats with severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2007;35(3):256-61.
19. Kim JB, Yu YM, Kim SW, Lee JK. Anti-inflammatory mechanism is involved in ethyl pyruvate-mediated efficacious neuroprotection in the postischemic brain. *Brain Res* 2005;1060(1-2):188-92.
20. Lee J, Kwon W, Jo Y, Suh G, Youn Y. Protective effects of ethyl pyruvate treatment on paraquat-intoxicated rats. *Hum Exp Toxicol* 2008;27(1):49-54.
21. Wang Q, Ding Q, Zhou Y, Gou X, Hou L, Chen S, et al. Ethyl pyruvate attenuates spinal cord ischemic injury with a wide therapeutic window through inhibiting high-mobility group box 1 release in rabbits. *Anesthesiology* 2009;110(6):1279-86.
22. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 1999;299:15-27.
23. Garcia YJ, Rodriguez-Malaver AJ, Penaloza N. Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices. *J Neurosci Methods* 2005;144(1):127-35.
24. Niehaus WG Jr, Samuelsson B. Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation. *Eur J Biochem* 1968;6(1):126-30.
25. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
26. Perreault SD, Goldman JM. Ovulation, oocyte maturation and oocyte function. In: Sipes IG, McQueen CA, Gandolfi AJ, 26. Editors. *Comprehensive Toxicology*. Oxford: Elsevier Science; 1997. p. 305-316. (Vol. 10)
27. Johari HA, Mahmoodi Nejad F, Amjadi GH. Effect of Ginger extract on the Hypothalamus- Pituitary-gonadal Axis in adult female rats treated with cyclophosphamide. *Pajouda* 2011;6(20):62-7. [Full Text in Persian]
28. Dellmann HD, Brown EM. Dellmann 's text book of veterinary histology. 3rd ed. Philadelphia: Lea Febiger Pub; 1987. p. 513.
29. Das UB, Mallick M, Debnath JM, Ghosh D. Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide- induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. *Asian J Androl* 2002;4(3):201-7.
30. LiD J, Xu ZS, Zhang ZH, Huang QY. Antagonistic effects of vitamin E on the testicular injury by cyclophosphamide in mice. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2006;12(4):318-22.
31. Mescher AL. Junquiers's basic histology, text and atlas. 13th ed. California: Lange Pub; 2013. p. 49-477.
32. Douglas NC, Nakhuda GS, Sauer MV, Zimmermann RC. Angiogenesis and ovarian function. *J Fertil Reprod* 2005;13(4):7-15.

33. Tsai-Turton M, Luong BT, Tan Y, Luderer U. Cyclophosphamide-induced optosis in COV434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion. *Toxicol Sci* 2007;98(1):216-30.
34. Chaudiere J, Ferrari-Illiou R. Intracellular antioxidant from chemical to biochemical mechanism. *Food Chem* 1999;37(9-10):949-62.
35. Krishna A, Terranova PF. Alterations in mast cell degranulation and ovarian histamine in the proestrous hamster. *Biol Reprod* 1985;32(5):1211-17.
36. Karaca T, Yoruk M, Uslu S. Distribution and quantitative patterns of mast cells in ovary and uterus of rat. *Arch Med Vet* 2007;39(2):135.
37. Stone KD, Prussin C, Metcalfe D. IgE, mast cells, basophils, and osinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2 Suppl 2):S73-S80.
38. Roaiah MM, Khatib H, Mostafa T. Mast cells in testicular biopsies of azoospermic men. *Andrologia* 2007; 39(5):185-9.

Protective Effect of Ethyl Pyruvate on Growth and Atresia of Ovarian Follicles in Cyclophosphamide Treated Mice

Fahimeh Khanmohammadi Ghane^{1*}; Rasoul Shahrooz²; Abass Ahmadi³; Mazdak Razi⁴

¹Master of Sciences in Histology, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran.

²Associate Professor of Human Anatomy, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran.

³Assistant Professor of Human Anatomy, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran.

⁴Assistant Professor of Histology, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran.

***Corresponding Author:**
Fahimeh Khanmohammadi Ghane, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran.

Email:
fahimekh685@yahoo.com

Received: 12 Jan, 2014

Accepted: 7 Jun, 2014

Abstract

Background and Objectives: The oxidative stress caused by side effects of cyclophosphamide reduce fertility, and even cause infertility in people that treated with this drug. In this project, the protective role of ethyl pyruvate on ovarian follicles after chemotherapy with cyclophosphamide evaluated.

Methods: In this experimental study, 15 female mice in age 8-9 weeks, divided into 3 groups. The control group, received normal saline (0.1ml, IP/day), Sham control group, received cyclophosphamide (15mg/kg, IP/week), and the experimental group, along with cyclophosphamide treated with ethyl pyruvate (40mg/kg, IP/day). After the end of treatment in day 21, levels of the hormone of estradiol, and serum antioxidant enzymes, Superoxide dismutase (SOD) and Total antioxidant (TAOC) and Malondialdehyde (MDA) levels in the left ovarian tissue was measured, and the right ovaries were used for histological and histomorphometrical studies. The obtained data were analyzed by SPSS statistical software, and ANOVA and TUKEY test at the level of ($p < 0.05$) performed.

Results: Results in sham control group showed a significant reduction in mean distribution of growing ovarian follicles, corpus luteum, and amount of sex hormone and serum TAOC and SOD, and a notable increase of preantral atretic follicles, mast cells and level of MDA in comparison to control group ($p < 0.05$). The treatment with ethyl pyruvate possess a significant protective effect on aforementioned parameters in comparison to sham control group ($p < 0.05$).

Conclusion: According to results of present study administration of ethyl pyruvate, along with chemotherapy was able to significantly prevent the adverse side effects of cyclophosphamide on ovarian tissue.

Keywords: Histomorphometry; Ovary; Ovarian Follicle; Atresia; Cyclophosphamide; Ethyl Pyruvate; Mice.