



مقاله پژوهشی

ارزیابی اثر محافظتی کروسین بر روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی در موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی (سوری) درمان شده با بوسولفان

حمیدرضا حسن زاده خانمیری، رسول شهروز^{*}، شاپور حسن زاده، غلامرضا نجفی

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

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۹/۰۲

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۴/۳۱

چکیده

زمینه و هدف: بوسولفان در کنار نقش درمانی دارای اثرات القای استرس اکسیداتیو و کاهش قدرت باروری است. هدف این مطالعه ارزیابی اثرات محافظتی کروسین بر باروری آزمایشگاهی در موش‌های درمان شده با بوسولفان است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی تعداد ۱۸ سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی ماده به وزن تقریبی ۲۵ گرم به ۶ گروه تقسیم شده و به مدت ۲۱ روز تیمار شدند. گروه کنترل حلال بوسولفان را به صورت داخل صفاقی تک دز به حجم ۰/۱ ml دریافت کردند. گروه کنترل شم فقط بوسولفان با دز ۱۰ mg/kg, IP تک دز دریافت کردند. گروه‌های تجربی شماره ۱، ۲، ۳ به همراه با بوسولفان کروسین با دزهای ۱۰۰ mg/kg/day, IP، ۲۰۰، ۴۰۰ دریافت نمودند. گروه کنترل مثبت فقط کروسین با دز ۴۰۰ mg/kg/day, IP دریافت کردند. پس از پایان دوره درمان حیوانات آسان کشی شده و پس از انجام مراحل لقاح داخل آزمایشگاهی مراحل رشد جنینی مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های حاصل با استفاده از روش آماری ANOVA یک طرفه و تست تعقیبی Bonferroni اختلاف بین تمامی گروه‌ها مورد مقایسه قرار گرفت. اختلاف در سطح $P < 0/05$ معنی دار توصیف گردید.

نتایج: نتایج نشان داد که تجویز کروسین همراه با بوسولفان باعث افزایش معنی داری در کیفیت اووسیت، میزان لقاح، روند رشد جنینی پیش از لانه گزینی و کیفیت جنین در مقایسه با گروه بوسولفان شد ($P < 0/05$). علاوه بر این در گروه دریافت کننده کروسین آثار مسمومیت مشاهده نگردید. نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان داد که کروسین می تواند از توان باروری جنس ماده در برابر آسیب های ناشی از بوسولفان محافظت کند.

کلمات کلیدی: بوسولفان، تخمدان، کروسین، موش سفید کوچک آزمایشگاهی (سوری)، لقاح داخل آزمایشگاهی

مقدمه

مواد آلیله کننده از جمله بوسولفان، جزء داروهای کشنده سلول 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 آلیله شدن DNA شده و از همانندسازی DNA و از ترجمه RNA ممانعت می کند و آلیله شدن نیز باعث اتصال متقاطع در DNA گردیده و نهایتاً از تکثیر سلول های سرطانی جلوگیری کرده و همچنین باعث مرگ برنامه دار سلول ها از طریق مسیر بیان پروتئین P53 می گردد (۱). همچنین تزریق بوسولفان در روز ۱۲ حاملگی موش ها باعث کاهش قابل توجهی در تعداد فولیکول ها، اووسیت ها و تأخیر در بلوغ فولیکول های حفره دار موش های نوزاد می گردد و در ضمن باعث کم شدن حجم و اندازه تخمدان نیز می گردد (۲). تحقیقات نشان داده است که بوسولفان از طریق القای استرس اکسیداتیو باعث فعال شدن مسیر مرگ برنامه دار در سلول های تخمدانی شده و نیز باعث مرگ سایر سلول ها می گردد (۳). استرس اکسیداتیو در نتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال های آزاد اکسیژن در مقابل ظرفیت دفاع آنتی اکسیدانی سلول ایجاد می شود که منجر به تولید انواع رادیکال های آزاد شامل آنیون سوپراکسید (O_2)، رادیکال هیدروکسیل (OH) و مشتقات غیر رادیکالی اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می شود. این رادیکال های آزاد به شدت ناپایدار بوده و به طور سریع و غیر اختصاصی با مولکول های زیستی واکنش نشان داده و منجر به ایجاد و گسترش انواع آسیب های سلولی از جمله

مواد آلیله کننده از جمله بوسولفان، جزء داروهای کشنده سلول 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 آلیله شدن DNA شده و از همانندسازی DNA و از ترجمه RNA ممانعت می کند و آلیله شدن نیز باعث اتصال متقاطع در DNA گردیده و نهایتاً از تکثیر سلول های سرطانی جلوگیری کرده و همچنین باعث مرگ برنامه دار سلول ها از طریق مسیر بیان پروتئین P53 می گردد (۱). همچنین تزریق بوسولفان در روز ۱۲ حاملگی موش ها باعث کاهش قابل توجهی در تعداد فولیکول ها، اووسیت ها و تأخیر در بلوغ فولیکول های حفره دار موش های نوزاد می گردد و در ضمن باعث کم شدن حجم و اندازه تخمدان نیز می گردد (۲). تحقیقات نشان داده است که بوسولفان از طریق القای استرس اکسیداتیو باعث فعال شدن مسیر مرگ برنامه دار در سلول های تخمدانی شده و نیز باعث مرگ سایر سلول ها می گردد (۳). استرس اکسیداتیو در نتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال های آزاد اکسیژن در مقابل ظرفیت دفاع آنتی اکسیدانی سلول ایجاد می شود که منجر به تولید انواع رادیکال های آزاد شامل آنیون سوپراکسید (O_2)، رادیکال هیدروکسیل (OH) و مشتقات غیر رادیکالی اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می شود. این رادیکال های آزاد به شدت ناپایدار بوده و به طور سریع و غیر اختصاصی با مولکول های زیستی واکنش نشان داده و منجر به ایجاد و گسترش انواع آسیب های سلولی از جمله

*نویسنده مسئول: رسول شهروز، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
Email: r.shahrooz@urmia.ac.ir
https://orcid.org/0000-0002-1470-010X

گردید (۱۹). در یک مطالعه دیگر فعالیت آنتی اکسیدانی کروسین با روش های تجربی و تئوریک مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه نشان داده شد که تجویز کروسین موجب کاهش سطح MDA و افزایش سطح قدرت احیاء آنتی اکسیدانی آهن Ferric reducing antioxidant power (FRAP) متعاقب استرس ایسکمی-رپرفیوژن کلیه گردید (۲۰).

از آنجایی که تا به حال مطالعه ای در زمینه تأثیر کروسین به عنوان یک آنتی اکسیدانت در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز بوسولفان بر روی رشد جنین های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی صورت نگرفته است، در این مطالعه، اثر محافظتی کروسین بر بهبود روند رشد جنین های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی در موش های تحت درمان با بوسولفان مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، ۱۸ موش سفید کوچک آزمایشگاهی (سوری) ماده نژاد NMRI با وزن تقریبی ۲۵ گرم به طور تصادفی به ۶ گروه مساوی تقسیم شده و به مدت ۲۱ روز تیمار شدند. حیوانات در شرایط استاندارد با دمای ۲۲±۲ درجه سانتی گراد، رطوبت ۶۰-۳۰ درصد و با سیکل نوری، ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند. آب و غذا به صورت آزاد در دسترس بود. مسائل اخلاقی در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی تحت نظر کمیته اخلاقی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه رعایت گردید (AECVU-172-2018). گروه کنترل، حلال BSF (بوسولفان) شامل حجم برابر DMSO و PBS (به حجم ۰/۱ میلی لیتر به صورت داخل صفاقی) دریافت نمودند، گروه کنترل شم BSF با دز ۱۰ میلی گرم بر هر کیلو گرم وزن بدن به صورت تک دز به طور داخل صفاقی دریافت نمودند، گروه های تجربی بوسولفان به روش گروه کنترل شم دریافت نمودند و همراه با آن در گروه های تجربی شماره ۱، ۲ و ۳ کروسین با حجم ۰/۳ میلی لیتر به طور روزانه به صورت داخل صفاقی به ترتیب با دزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر هر کیلو گرم وزن بدن دریافت نمودند. گروه کنترل مثبت، فقط کروسین با دز ۴۰۰ میلی گرم بر هر کیلو گرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. برای انجام این مطالعه به تحریک تخمک گذاری نیاز بود که بدین منظور پس از پایان دوره درمان و ۷۲ ساعت قبل از لقاح آزمایشگاهی (IVF) تزریق ۷/۵ واحد

پراکسیداسیون غشاء پلاسمایی، اکسیداسیون اسیدهای آمینه و نوکلئیک، مرگ برنامه دار یا آپوپتوز و نکروز می شود که در نهایت منجر به کاهش قدرت زیست پذیری و تکوین جنین ها در محیط کشت می گردد (۴-۵). بوسولفان به عنوان دارویی مهم و مؤثر در درمان سرطان، علی رغم ایجاد بهبودی در بیماران سرطانی، در بدن به عنوان یک عامل تولید کننده استرس اکسیداتیو عمل کرده و سطح تولید ROS را افزایش می دهد. لذا جهت تعدیل و جلوگیری از اثرات استرس اکسیداتیو ایجاد شده به وسیله بوسولفان عاملی نظیر کروسین که دارای نقش آنتی اکسیدانی است، می تواند مفید واقع شود.

کارتنوئیدها از طریق عملکرد به عنوان آنتی اکسیدانت سلول ها و بافت ها را از آسیب رادیکال های آزاد محافظت نموده و دارای نقش مؤثری در سلامت انسان می باشند (۶). گیاهی به نام *Crocus sativus* L که عموماً سافرون نامیده می شود، گیاه بدون پایه از خانواده Iridaceae است. ترکیبات اصلی سافرون؛ کروسین، سافرانال و پیکروکروسین می باشند. کروسین استر گلیکوزیده شده کروستین بوده که به طور غیرمعمول از کاروتینوئیدهای محلول در آب بوده و علت اصلی رنگ آن است (۶). مطالعات فراوان نشان داده اند که کروسین دارای اثرات فارماکولوژیکی مانند محافظت در برابر بیماری های قلبی عروقی (۷، ۸، ۹)، ممانعت از تکثیر سلول های توموری (۱۰)، محافظت سلول های عصبی (۱۱ و ۱۲) و محافظت از سلول های کبدی (۱۳) است. همچنین گزارش شده است که کروسین از پراکسیداسیون چربی در کلیه (۱۴) و آسیب عضلات اسکلتی در استرس ایسکمی-رپرفیوژن در موش صحرایی جلوگیری می نماید (۱۵). در چند مدل مطالعه داخل آزمایشگاهی نشان داده شده است که کروسین دارای عمل از بردن رادیکال های آزاد است (۱۶ و ۱۷).

هنگامی که کروسین در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار می گیرد به نظر می رسد که دارای فعالیت آنتی اکسیدانی است. این فعالیت به نیمه متصل به قند آن ارتباط پیدا می کند (۱۸). در یک مطالعه تجویز کروسین به صورت داخل صفاقی در موش های صحرایی دیابتی باعث شد که در کبد و کلیه سطح اسید تیوباربیتوریک Thiobarbitouric acid reactive substance (TBRS) افزایش و تیول تام کاهش یافته و موجب پایین آمدن معنی دار سطح قند خون گردید. اثرات آنتی اکسیدانی کروسین موجب کاهش پراکسیداسیون چربی در کبد و کلیه

دست آمدند (۲۱). زیگوت‌های حاصله از همه گروه‌ها، در محیط کشت HTF به مدت ۱۲۰ ساعت کشت داده شدند و برای بررسی تأثیر تنش اکسیداتیو ناشی از تجویز بوسولفان و اثر محافظتی کروسین، در زیر میکروسکوپ اینورت، مراحل رشد جنینی مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی میزان شکافتگی، ۲۴ ساعت بعد از کشت صورت گرفت و در زیگوت‌های موجود در هر گروه، جنین‌ها از نظر میزان فراگمانتاسیون، طی کردن مراحل رشد جنینی و تعداد جنین‌های متوقف‌شده با توجه به فاکتورهای مختلفی نظیر لیز شدن جنین‌ها، نکروتیک بودن آن‌ها، فراگمانتاسیون و وجود وزیکول‌های سیتوپلاسمیک صورت گرفت (۲۱). کیفیت جنین‌ها، تعداد جنین‌های رشد کرده، درصد شکافتگی با بررسی درصد جنین‌های دوسلولی، میزان جنین‌های متوقف‌شده و درصد بلاستوسیست‌های ایجادشده در طی ۱۲۰ ساعت انکوباسیون در هر گروه مورد ارزیابی قرار گرفت. (شکل ۱)

آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Version 16.00, USA) انجام شد. داده‌های حاصله با استفاده از روش آماری ANOVA یک‌طرفه و تست تعقیبی Bonferroni اختلاف بین تمامی گروه‌ها مورد مقایسه قرار گرفت. اختلاف در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار توصیف گردید و تمامی داده‌ها با میانگین و معیار خطا نشان داده شدند.

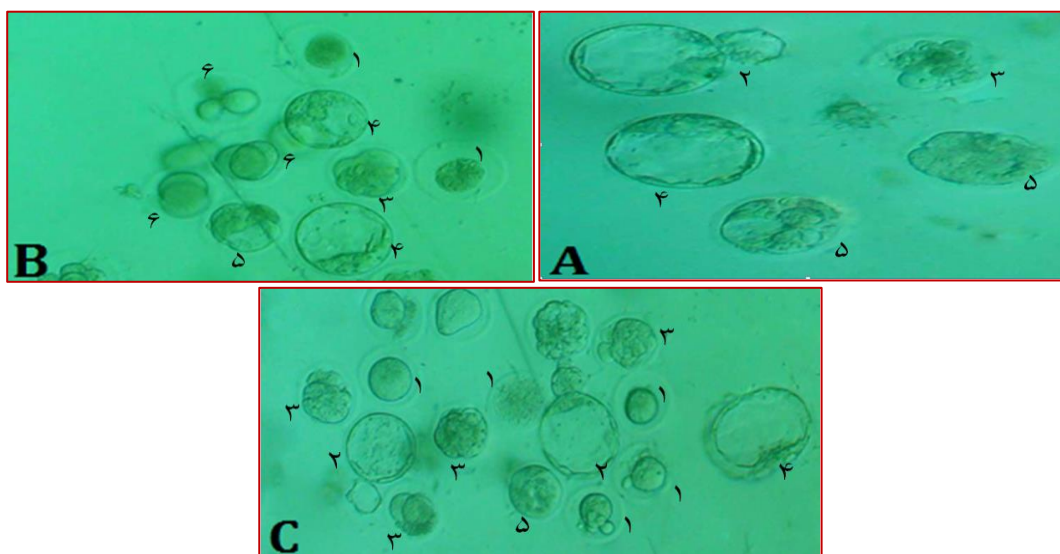
نتایج

نتایج حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی نشان داد که تعداد اووسیت‌های به‌دست‌آمده در گروه‌های مختلف دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P < 0.05$) و در گروه بوسولفان به‌طور معنی‌دار نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داد ($P < 0.05$)، درحالی‌که استفاده از بوسولفان به همراه کروسین با دزهای مختلف موجب افزایش معنی‌دار اووسیت‌های به‌دست‌آمده گردید و این افزایش در گروه‌های دریافت‌کننده کروسین با دزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تا حد گروه کنترل بوده به‌طوری‌که با آن گروه فاقد اختلاف معنی‌دار بودند.

بررسی میانگین تعداد زایگوت‌های به‌دست‌آمده در گروه‌های مختلف نیز نشان داد که میانگین تعداد زایگوت‌ها در گروه بوسولفان تقریباً نصف تعداد آن‌ها در گروه کنترل بود ($P < 0.05$)، درحالی‌که تجویز بوسولفان به همراه کروسین وابسته به دز کروسین بوده و تعداد زایگوت‌های لقاح یافته را نسبت به گروه

هورمون PMSG (ساخت شرکت Folligon، هلند) به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر و ۴۸ ساعت بعد، تزریق ۷/۵ واحد هورمون HCG (ساخت شرکت Folligon، هلند) به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر به روش داخل صفاقی انجام شد. عمل تخمک‌گذاری ۱۳ ساعت بعد از تزریق HCG انجام گردید.

مرحله اول کار برای انجام عمل IVF، تهیه اسپرم‌های نرمال از ۶ قطعه موش سفید کوچک آزمایشگاهی نر بالغ بود که به روش بی‌هوشی با تزریق کتامین (ساخت شرکت Rotexmedica، آلمان) ۲۵mg/kg داخل صفاقی و با تزریق دز بالای دارو آسان‌کشی شدند. سپس پوست ناحیه شکمی با اتانول ۷۰ درصد استریل شده و پس از ایجاد برش در ناحیه شکم و جدا کردن بافت‌های همبندی، اطراف دم اپی دیدیم همراه با مقداری کانال دفران از بیضه جدا و به داخل پتری دیش ۳ سانتی‌متری حاوی محیط کشت HTF، دارای ۴ میلی‌گرم BSA (سیگما، آمریکا) که قبلاً جهت تعادل در داخل انکوباتور قرار داده شده بود منتقل شد و بعد از ایجاد چند برش در دم اپی دیدیم و فشار در کانال دفران برای خروج اسپرم‌ها، پتری دیش‌ها در داخل انکوباتور دی‌اکسید کربن گذاشته شدند. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه اسپرم‌ها خارج و در محیط پخش شدند. سپس اسپرم‌ها شستشو داد شد و با استفاده از روش شناورسازی، اسپرم‌های متحرک جدا و جهت ظرفیت‌یابی، به مدت یک ساعت در انکوباتور دی‌اکسید کربن با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (۲۱). در این مطالعه نمونه‌های اسپرم نرمال با تحرک بالای ۸۰ درصد و به تعداد یک‌میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت استفاده شد. مرحله دوم از کار، تخمک‌گیری از موش‌های ماده بود که بدین منظور، ۱۳ ساعت پس از تزریق HCG (صبح روز بعد) با آسان‌کشی حیوانات بعد از بی‌هوشی با تزریق کتامین (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، درون صفاقی) با تزریق دز بالای دارو آسان‌کشی شده، سپس لوله‌های رحمی جدا شد و در داخل محیط کشت BSA ۴mg/L + HTF با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد که از قبل آماده شده بود قرار داده شد و با استفاده از روش کالبدشکافی تخمک‌ها خارج شده و پس از شستشو، به محیط لقاح در زیر روغن معدنی حاوی محیط کشت HTF (حاوی ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA) منتقل شدند و سپس اسپرم‌ها به محیط کشت منتقل شد. عمل لقاح حدود ۳ تا ۵ ساعت بعد از اضافه کردن اسپرم صورت گرفت و بدین ترتیب زیگوت‌ها به



شکل ۱- A. گروه کنترل، تمایز درصدی از جنین‌ها به بلاستوسیست باکیفیت مناسب بعد از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون و درصدی از جنین‌ها که در مراحل مختلف رشد متوقف شده‌اند. B. گروه کنترل شم، درصد کمی از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیده و بلاستوسیست‌های حاصله کیفیت مناسبی از نظر مورفولوژی ندارند. C. گروه درمان شده با بوسولفان به همراه کروسین ۱۰۰ که در مقایسه با گروه کنترل شم، درصد بالایی از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیده و بلاستوسیست‌های حاصله کیفیت مناسبی از نظر مورفولوژی دارند و درصد کمی از جنین‌ها متوقف شده‌اند. (میکروسکوپ اینورت، بزرگنمایی $\times 400$)

۱- اووسیت ۲- جنین در حال هج شدن ۳- مورولا ۴- بلاستوسیست ۵- بلاستوسیست اولیه ۶- جنین ارست شده

بوسولفان افزایش داد ($P < 0.05$).

همچنین نشان داده شد که فرایند شکافتگی در میانگین تعداد زایگوت‌های دوسلولی در گروه بوسولفان نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌دار کاهش نشان داد ($P < 0.05$)، ولی در گروه‌های دریافت‌کننده بوسولفان به همراه کروسین با دزهای مختلف میانگین تعداد زایگوت‌های دوسلولی وابسته به دز کروسین نسبت به گروه بوسولفان افزایش نشان داد ($P < 0.05$).

ارزیابی میانگین تعداد بلاستوسیست‌های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی نشان داد که تعداد بلاستوسیست‌ها در گروه بوسولفان به طور معنی‌دار نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($P < 0.05$)، ولی در گروه‌های دریافت‌کننده بوسولفان به همراه کروسین به طور وابسته به دز کروسین نسبت به گروه بوسولفان افزایش نشان داد ($P < 0.05$).

همچنین ارزیابی میانگین تعداد زایگوت‌های هج شده نشان داد که در گروه بوسولفان تعداد زایگوت‌های هج شده نسبت به گروه کنترل کاهش یافته ولی در گروه‌های دریافت‌کننده بوسولفان به همراه کروسین نسبت به گروه بوسولفان افزایش نشان داد و این افزایش در گروه دریافت‌کننده کروسین با دز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بیشتر بود، ولی گروه‌های

مختلف با یکدیگر فاقد اختلاف معنی‌دار بودند.

بررسی میانگین جنین‌های متوقف‌شده (ارست شده) نشان داد که تعداد این نوع جنین‌ها در گروه بوسولفان نسبت به گروه کنترل افزایش یافت، ولی این افزایش فاقد اختلاف معنی‌دار بود. درحالی‌که استفاده از بوسولفان به همراه کروسین با دزهای مختلف موجب کاهش معنی‌دار میانگین تعداد جنین‌های متوقف‌شده گردید ($P < 0.05$).

همچنین مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از کروسین به‌تنهایی در گروه موش‌های سالم فاقد اثرات سمی بوده و تمامی پارامترهای لقاح داخل آزمایشگاهی با گروه کنترل سالم فاقد اختلاف معنی‌دار بود (جدول ۱).

مقایسه آماری داده‌های حاصل از مطالعه حاضر بین گروه‌های مورد مطالعه در رابطه با تمامی پارامترهای لقاح داخل آزمایشگاهی به‌استثناء تعداد زیگوت‌های هج شده دارای اختلاف معنی‌دار بودند (جدول ۲).

بحث

این مطالعه نشان داد که کروسین دارای اثر آنتی‌اکسیدانی قوی بوده و در برابر استرس اکسیداتیو ایجادشده توسط بوسولفان موجب بهبودی در تمامی پارامترهای مربوط به لقاح داخل



جدول ۱- درصد تعداد جنین‌های رشد یافته و متوقف شده در مراحل مختلف و مقایسه آن‌ها در بین گروه‌های مورد مطالعه (Mean±Se)

گروه	اووسیت	زیگوت	دوسلولی	بلاستوسیست	هچ	اررست
کنترل	۲۴/۳ ± ۳/۰۵ ^c	۷۹ ± ۶/۵ ^c	۶۹/۶ ± ۱/۵۲ ^c	۵۶ ± ۴/۵۸ ^c	۳۸ ± ۶ ^a	۴۳/۳ ± ۴/۱۶ ^a
بوسولفان	۱۴ ± ۱/۵۳ ^a	۴۸/۳ ± ۵/۶ ^a	۴۱/۳ ± ۵/۶ ^a	۲۳ ± ۶/۲ ^a	۲۷ ± ۳/۶ ^a	۷۲ ± ۶/۲ ^a
بوسولفان + کروسین ۱۰۰	۱۹ ± ۲ ^b	۵۵/۶ ± ۳/۲ ^{ab}	۴۹ ± ۲/۶ ^{ab}	۳۱ ± ۲ ^b	۴۷/۳ ± ۳/۰۲ ^a	۶۵/۶ ± ۴/۵ ^b
بوسولفان + کروسین ۲۰۰	۲۱/۶ ± ۲/۵ ^{bc}	۶۳ ± ۴/۵ ^b	۵۰/۶ ± ۶/۰۲ ^b	۳۴/۶ ± ۳/۲۱ ^b	۱۹/۳ ± ۵/۱ ^a	۶۴/۳ ± ۳/۲۱ ^b
بوسولفان + کروسین ۴۰۰	۲۱/۳ ± ۱/۵۲ ^{bc}	۶۴ ± ۹/۶ ^b	۵۴/۳ ± ۶/۶۵ ^b	۳۴ ± ۴/۵ ^b	۳۷/۳ ± ۲/۷ ^a	۶۶ ± ۵/۵ ^b
کروسین ۴۰۰	۲۳/۳ ± ۲/۵۱ ^b	۸۲ ± ۶ ^c	۶۶/۶ ± ۲/۰۸ ^c	۵۶/۳ ± ۴/۵ ^c	۳۸ ± ۴/۵ ^a	۴۲/۳ ± ۴/۵ ^a

حروف نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۵) است.

جدول ۲- تجزیه واریانس ANOVA

df	Mean square	F	sig
۵	۳۸/۹۳۳	۷/۶۱۷	/۰۲
۱۲	۵/۱۱۱		
۱۷			
۵	۵۱۲/۵۳۳	۱۳/۰۴۹	/۰۰۰
۱۲	۳۹/۲۷۸		
۱۷			
۵	۳۵۵/۶۵۶	۱۶/۸۴۷	/۰۰۰
۱۲	۲۱/۱۱۱		
۱۷			
۵	۵۷۱/۸۳۳	۲۹/۶۶۳	/۰۰۰
۱۲	۱۹/۲۷۸		
۱۷			
۵	۲۸۴/۳۲۲	/۵۵۳	/۷۳۴
۱۲	۵۱۴/۰۵۶		
۱۷			
۵	۵۵۹/۱۲۲	۲۴/۲۵۱	/۰۰۰
۱۲	۲۳/۰۵۶		
۱۷			

اثر گروه‌های مختلف دارو و آنتی‌اکسیدان بر روی تمامی پارامترهای اندازه‌گیری شده به جز گروه Hatching معنی‌دار بود.

ظرفیت ژنتیکی و ذخیره انرژی اووسیت را حفظ نموده و میزان لقاح را افزایش دهد. در یک مطالعه نتایج بررسی درصد لقاح داخل آزمایشگاهی، اسپرم‌ها نشان از افزایش لقاح، جنین‌های دوسلولی و بلاستوسیست‌ها در گروه دریافت‌کننده Cr به همراه Cp نسبت به گروه دریافت‌کننده سیکلوفسفامید (Cp) به‌تنهایی گردید. همچنین نشان داده شد که در موش‌های دریافت‌کننده Cr به همراه Cp از افزایش تعداد کلی جنین‌های متوقف‌شده تیپ I، II و III در مقایسه با گروه دریافت‌کننده Cp به‌تنهایی جلوگیری شد. در همین مطالعه تجویز کروسین به همراه Cp موجب کاهش مالون دی آلدئید MDA و اسپرم‌های با DNA آسیب‌دیده در مقایسه با گروه دریافت‌کننده Cp به‌تنهایی گردید (۳۰). در یک مطالعه دیگر نیز نشان داده شد که تجویز Cr در موش‌های درمان شده توسط Cp باعث شد که ضرایب تمایز لوله-ای، تجمعی و اسپرمیوز، ضخامت کپسول بیضه، تعداد سلول-های سرتولی فعال و همچنین مقادیر سوپراکسید دیسموتاز و تستوسترون نسبت به گروه دریافت‌کننده Cp به‌تنهایی طور معنی‌دار ($p < 0.05$) افزایش یابد (۳۱). بوسولفان، آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز (Glutathione S-Transferase) GSH را به‌طور کامل از بین می‌برد و این موضوع تأییدکننده سمیت آن از طریق القای استرس اکسیداتیو بوده و می‌تواند از بازسازی سطح GSH جلوگیری کند (۳۲). یافته‌های قبلی اثرات محافظتی و سودمند آنتی‌اکسیدانت‌ها را در ناباروری و اختلالات سیستم تولیدمثل تأیید می‌کنند (۳۳). در یک مطالعه اثرات محافظتی کروسین بر روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی در موش‌های سوری درمان شده با سیکلوفسفامید مورد ارزیابی قرار گرفت و نشان داده شد که کروسین موجب افزایش معنی‌دار تعداد اووسیت‌های مناسب، درصد لقاح، جنین‌های دوسلولی، بلاستوسیست‌ها و کاهش معنی‌دار تعداد جنین‌های متوقف‌شده نسبت به گروه کنترل شم گردید (۳۴). تجویز خوراکی کروسین در موش‌های نر باعث بهبود قابل‌ملاحظه‌ای در همه پارامترهای جنسی مانند قدرت باروری، شاخص‌های باروری و اندازه‌ی بیضه می‌شود. علاوه بر این، غلظت هورمون محرک رشد فولیکول‌های تخمدانی Follicular Stimulating hormone (FSH) و تستوسترون و وزن بیضه، وزیکول سمینال و پروستات به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت. در مطالعه حاضر نشان داده شد که کروسین در فرایند شکافتگی زایگوت نیز دارای اثرات مثبت بوده و تعداد زایگوت‌های دوسلولی

آزمایشگاهی می‌گردد. در یک مطالعه تجویز یک دز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان در موش به‌طور قابل‌توجهی تعداد فولیکول‌های آتریک را افزایش داد که نشان‌دهنده عوارض جانبی بوسولفان در سلول‌های تکثیر شونده است. بوسولفان بر روی سلول‌ها با توانایی تقسیم بیشتر از طریق آلکیلایسیون DNA تأثیر می‌گذارد (۲۲). در گزارش دیگری، درمان با بوسولفان/سیکلوفسفامید که به‌صورت تک دز استفاده شد، باعث کاهش تعداد فولیکول‌ها و کاهش میزان استرادیول و پروژسترون در موش‌های درمان شده گردید (۲۳) و همچنین درمان با بوسولفان در رت موجب کاهش معنی‌داری در تعداد تخمک‌ها و وزن و حجم تخمدان در هنگام تزریق در روز ۱۲ بارداری شد (۲). تزریق بوسولفان در موش‌های باردار نشان داده است که اثرات بوسولفان بر روی تخمدان‌های جنین و نوزادان بستگی به سن در زمان درمان دارد. حداکثر اثر جانبی بوسولفان که موجب بروز نازایی فرزندان ماده شد و در روزهای ۱۳ تا ۱۶ بارداری در این مطالعه مشاهده گردید. اکثر موش‌های متولدشده در روز ۱۱ بارداری و تمام فرزندان که در روز ۱۸ مورد درمان با بوسولفان بودند، باردار شدند (۲۴). در مطالعه حاضر جهت مقابله با عوارض جانبی بوسولفان از کروسین که یکی از ترکیبات گیاهی به نام کوروس استاویوس ال (Corcus sativus L (Iridaceae) استفاده شد که عموماً به‌عنوان زعفران Saffron شناخته می‌شود، ماده اصلی مؤثر در زعفران Corcetin و Crocin می‌باشند (۲۵). این مواد می‌توانند برای درمان بیماری‌هایی که همراه با دژنره شدن عصبی و از دست رفتن حافظه می‌باشند، استفاده شوند (۲۶). مطالعات داروشناسی نشان داده که عصاره زعفران دارای اثر ضد توموری (۲۷) و کاهش‌دهنده چربی خون و نیز از بین بردن رادیکال‌های آزاد است (۱۱). اثرات ضدافسردگی آن در انسان (۲۸) گزارش شده است. ترکیبات موجود در زعفران دارای اثرات ضد درد و ضدالتهاب (۲۹) است. در مطالعه حاضر کروسین موجب گردید که میانگین تعداد اووسیت‌های به‌دست‌آمده در مقایسه با گروه بوسولفان افزایش یابد و این نشان می‌دهد که کروسین موجب تسریع روند رشد فولیکول‌های تخمدانی باوجود شرایط استرس اکسیداتیو ناشی از بوسولفان می‌شود. همچنین مطالعه حاضر نشان داد که میزان لقاح نیز با استفاده از کروسین در حیوانات دریافت‌کننده بوسولفان نسبت به گروه بوسولفان تنها افزایش یابد و این افزایش وابسته به دز کروسین بود؛ بنابراین، کروسین احتمالاً توانست که باوجود شرایط استرس اکسیداتیو

بوسولفان به واسطه استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد و یک آنتی‌اکسیدانت قوی مانند کروسین می‌تواند سیستم تولیدمثلی را از آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو ایجاد شده به وسیله بوسولفان که اغلب موجب ناباروری می‌شود محافظت نماید. به نظر می‌رسد که اثر کروسین وابسته به دز تجویز شده بوده و دز ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به ۲۰۰ دارای اثر بهتری بود، ولی این دو گروه در اغلب پارامترهای لقاح داخل آزمایشگاهی فاقد اختلاف معنی‌دار بودند.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه دکتری تخصصی استخراج شده و با مساعدت‌های بی‌دریغ کارکنان آزمایشگاه بافت‌شناسی و جنین‌شناسی و معاونت پژوهشی محترم دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به انجام رسیده است که از ایشان صمیمانه تقدیر و تشکر می‌گردد. این مطالعه بر اساس استانداردهای رفتار با حیوانات آزمایشگاهی تحت نظارت دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه با کد اخلاقی AECVU-172-2018 انجام گرفت.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

را در گروه‌های دریافت‌کننده کروسین با دزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن افزایش داد. این نشان‌دهنده توانایی کروسین در حفظ توانایی اووسیت در شرایط استرس اکسیداتیو برای ادامه روند رشد زایگوت پس از لقاح برای انجام موفقیت‌آمیز روند شکافتگی است. اثرات آنتی‌اکسیدانی کروسین در روند رشد جنینی یا مرحله تشکیل بلاستوسیست نیز مؤثر بود و به‌طور وابسته به دز موجب افزایش میانگین تعداد بلاستوسیست‌ها گردید. کروسین موجب از بین رفتن رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط بوسولفان شده (۱۸) و از این طریق باعث کاهش میانگین تعداد جنین‌های متوقف شده در گروه‌های دریافت‌کننده کروسین با دزهای مختلف گردید. در مجموع از یافته‌های این مطالعه چنین استنباط می‌شود که استفاده از کروسین می‌تواند در سمیت تولیدمثلی ناشی از مصرف بوسولفان در موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی ماده دارای اثرات بالقوه‌ای باشد، بنابراین کارآزمایی بالینی و مطالعات تجربی گسترده‌ای در این زمینه پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

با در نظر گرفتن تمامی نتایج به‌دست آمده، مطالعه حاضر این ایده را تقویت می‌کند که سمیت تولیدمثلی ناشی از تجویز

References

1. Probin V, Wang Y, Bai A, Zhou D. Busulfan selectively induces cellular senescence but not apoptosis in WI38 fibroblasts via a p53-independent but extracellular signal-regulated kinase-p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006 Nov 1;319(2):551-60.
2. Pelloux MC, Picon R, Gangnerau MN, Darmoul D. Effects of busulfan on ovarian folliculogenesis, steroidogenesis and anti-müllerian activity of rat neonates. *Acta endocrinologica*. 1988 Jun 1;118(2):218-26.
3. Probin V, Wang Y, Zhou D. Busulfan-induced senescence is dependent on ROS production upstream of the MAPK pathway. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007 Jun 15;42(12):1858-65.
4. 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 Reproduction Science*. 2001 Mar 30;65(3-4):215-23.
5. Chaudière J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and chemical toxicology*. 1999 Sep 1;37(9-10):949-62.
6. Rios JL, Recio MC, Giner RM, Manes S. An update review of saffron and its active constituents. *Phytotherapy Research*. 1996 May;10(3):189-93.
7. He SY, Qian ZY, Tang FT, Wen N, Xu GL, Sheng L. Effect of crocin on experimental atherosclerosis in quails and its mechanisms. *Life sciences*. 2005 Jul 8;77(8):907-21.
8. Shen XC, Qian ZY. Effects of crocetin on antioxidant enzymatic activities in cardiac hypertrophy induced by norepinephrine in rats. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006 Apr 1;61(4):348-52.
9. Xiang M, Qian ZY, Zhou CH, Liu J, Li WN. Crocetin inhibits leukocyte adherence to vascular endothelial cells induced by AGEs. *Journal of ethnopharmacology*. 2006 Aug 11;107(1):25-31.

10. Magesh V, Singh JP, Selvendiran K, Ekambaram G, Sakthisekaran D. Antitumour activity of crocetin in accordance to tumor incidence, antioxidant status, drug metabolizing enzymes and histopathological studies. *Molecular and cellular biochemistry*. 2006 Jul 1;287(1-2):127-35.
11. Ahmad AS, Ansari MA, Ahmad M, Saleem S, Yousuf S, Hoda MN, Islam F. Neuroprotection by crocetin in a hemi-parkinsonian rat model. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2005 Aug 1;81(4):805-13.
12. Ochiai T, Ohno S, Soeda S, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. Crocin prevents the death of rat pheochromyctoma (PC-12) cells by its antioxidant effects stronger than those of α -tocopherol. *Neuroscience letters*. 2004 May 13;362(1):61-4.
13. Tseng TH, Chu CY, Huang JM, Shiow SJ, Wang CJ. Crocetin protects against oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Cancer letters*. 1995 Oct 20;97(1):61-7.
14. Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Ziaee T, Danaee A. Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. *J Pharm Pharm Sci*. 2005 Aug 22;8(3):387-93. [In persian]
15. Hosseinzadeh H, Modaghegh MH, Saffari Z. *Crocus sativus* L. (Saffron) extract and its active constituents (crocin and safranal) on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2009;6(3):343-50. [In persian]
16. Hosseinzadeh H, Shamsaie F, Mehri S. Antioxidant activity of aqueous and ethanolic extracts of *Crocus sativus* L. stigma and its bioactive constituents, crocin and safranal. *Pharmacognosy Magazine*. 2009 Dec 1;5(20):419. [In persian]
17. Mousavi SH, Tayarani NZ, Parsaee H. Protective effect of saffron extract and crocin on reactive oxygen species-mediated high glucose-induced toxicity in PC12 cells. *Cellular and molecular neurobiology*. 2010 Mar 1;30(2):185-91. [In persian]
18. Chen Y, Zhang H, Tian X, Zhao C, Cai L, Liu Y, Jia L, Yin HX, Chen C. Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of *Gardenia jasminoides* ELLIS and *Crocus sativus* L.: A relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents. *Food Chemistry*. 2008 Aug 1;109(3):484-92.
19. Rajaei Z, Hadjzadeh MA, Nemati H, Hosseini M, Ahmadi M, Shafiee S. Antihyperglycemic and antioxidant activity of crocin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of medicinal food*. 2013 Mar 1;16(3):206-10. [In persian]
20. Najafi H, Yarijani ZM, Najafi M. Theoretical and Experimental in vivo Study of Antioxidant Activity of Crocin in Order to Propose Novel Derivatives with Higher Antioxidant Activity and Their Delivery via Nanotubes and Nanocones. *Inflammation*. 2017 Oct 1;40(5):1794-802. [In persian]
21. Mozaffari AA, Shahrooz R, Ahmadi A, Malekinejad H, Mardani K. Assessment of protective effect of ethyl pyruvate on sperm parameters, and trend of embryological development after in vitro fertilization (IVF) in phenylhydrazine treated mice. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*. 2017;22(1):11-24. [In persian]
22. Pazhuhi H, Pousty I, Tajik P, BOKAIE S. Protective effects of melatonin on mature ovarian follicles structures in adult mice treated with busulfan. *Int J Biol Pharm Allied Sci*. 2015;4(9):5833-47. [In persian]
- Jiang Y, Zhao J, Qi HJ, Li XL, Zhang SR, Song DW, Yu CY, Gao JG. Accelerated ovarian aging in mice by treatment of busulfan and cyclophosphamide. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2013 Apr 1;14(4):318-24.
23. Hemsworth BN, Jackson H. Effect of busulphan on the developing ovary in the rat. *Journal of reproduction and fertility*. 1963 Oct 1;6(2):229-33.
24. Abdullaev FJ, Caballero-Ortega H, Riveron-Negrete L, Pereda-Miranda R, Rivera-Luna R, Manuel JH, Perez-Lopez I, Espinosa-Aguirre JJ. In vitro evaluation of the chemopreventive potential of saffron. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*. 2002;54(5):430-6.
25. Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Experimental biology and medicine*. 2002 Jan;227(1):20-5.
26. Karimi G, Hosseinzadeh H, Khaleghpanah P. Study of antidepressant effect of aqueous and ethanolic extract of *Crocus sativus* in mice. *Iran. J. Basic Med. Sci*. 2001; 4: 11-15 [In persian]
27. Hosseinzadeh H, Younesi H. Petal and stigma extracts of *Crocus sativus* L. have antinociceptive and anti-inflammatory effects in mice. *BMC Pharmacol*. 2002; 2, 7 [In persian]
28. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008 Jan;9(1):47.
29. Bakhtiary Z, Shahrooz R, Ahmadi A, Soltanolinejad F. Protective Effect of Crocin on DNA Damage of Sperm and in Vitro Fertilization (IVF) in Adult Male Mice Treated with Cyclophosphamide. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences (JMUMS)*. 2014 Dec 28;24(118). [In persian]
30. Bakhtiary Z, Shahrooz R, Ahmadi A, Malekinejad H, Mostafavi M. Study of protective effects of crocin on testicular histomorphometry and serological parameters in cyclophosphamide on treated adult mice. *The Journal of Urmia University of Medical Sciences*. 2014;25(7):663-73. [In persian]
31. DeLeve LD, Wang X. Role of oxidative stress and glutathione in busulfan toxicity in cultured murine hepatocytes. *Pharmacology*. 2000;60(3):143-54.



32. Safarnavadeh T, Rastegarpanah M. Antioxidants and infertility treatment, the role of Satureja Khuzestanica: A mini-systematic review. Iranian journal of reproductive medicine. 2011;9(2):61. [In persian]

33. Khan Mohammadi F, Shahrooz R, Ahmadi A, Razi M. Evaluation of Protective Effects of Crocin Onembyo Developing Process in in Vitro Fertilization (IVF) in Cyclophosphamide Treated Mice. Armaghane danesh. 2014 May 15;19(2):124-35. [In persian]



Original Article

Evaluation of the Protective Effect of Crocin on the Development of Embryos from In Vitro Fertilization (IVF) in Busulphan-treated Mice

Hasanzadeh Khanmiri HR, Shahrooz R*, Hasanzadeh Sh, Najafi Gh

Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Received: 22 Jul 2018

Accepted: 23 Nov 2018

Abstract

Background & Objective: Busulfan (BSF) besides the therapeutic effects, performs oxidative stress and decreasing fertilizing capacity. Therefore, the present study was aimed to evaluate the protective effects of Crocin, on in vitro fertilization (IVF) process in busulfan treated mice.

Materials & Methods: In this study eighteen mature female mice (25g), were divided into 6 groups and treated for 21 days. The control group received alone resolvent of busulfan (0.1 ml) intraperitoneally (IP) single dose, and sham control group received BSF alone (10mg/kg, IP/single dose) and experimental groups 1, 2, 3 received BSF(10mg/kg/single dose) with Crocin (100, 200, 400mg/kg/day, IP). Positive control group received alone Crocin (400mg/kg, IP/day). At the end of the treatment period, animals were euthanized and after performing the IVF, early embryo development was evaluated. The obtained data were compared between all groups and analyzed using one-way ANOVA, followed by Bonferroni *post-hoc* test. A *P*-value <0.05 was considered significant.

Results: Results showed that, the administration of crocin along with busulfan increased significantly oocyte quality, fertilization rate, pre-implantation embryonic development and quality of embryo in comparison to group that received busulfan ($P<0.05$). In addition, in the group that received crocin any toxicity has not been observed.

Conclusion: The present study indicated that crocin can protect female fertility potential against busulfan induced damages.

Keywords: Busulfan, Ovary, Crocin, Mice, In Vitro Fertilization

*Corresponding Author: : Shahrooz Rasool, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Email: r.shahrooze@urmia.ac.ir

<https://orcid.org/0000-0002-1470-010X>