ORIGINAL ARTICLE

Protective Effect of Crocin on DNA Damage of Sperm and in Vitro Fertilization (IVF) in Adult Male Mice Treated with Cyclophosphamide

Zahra Bakhtiary[1],
Rasoul Shahrooz[2],
Abbas Ahmadi[3],
Farhad Soltanalinejad[3]

[1] MSc in Comparative Histology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
[2] Associate Professor, Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

(Received Jun 22, 2014 ; Accepted November 1, 2014)

Abstract

Background and purpose: Oxidative stress induced by cyclophosphamide (CP), a chemotherapeutic agent, causes vulnerability of sperm and declining the fertility power. Then in this study the effect of crocin (saffron extract) on amelioration of these side effects was investigated.

Materials and methods: In this study 24 adult male mice were divided in three groups (n=8). Control group received normal saline (0.2 ml/day, IP), CP group received cyclophosphamide (15 mg/kg/week, IP), and CP+Cr group received crocin (200 mg/kg/day, IP) along with CP for 35 days. Then the animals were euthanized and malondialdehyde (MDA) in testis was assayed. After collection of sperm from caudate of epididymis, the rate of DNA damage was calculated by acridine orange staining. After stimulation of ovulation in 72 female adult mice, oocytes were collected and transferred in HTF medium that contained BSA. Then, in-vitro fertilization (IVF) was done with capacitated sperms. The rate of fertilization and primitive embryonic growth were evaluated for 120 hours.

Results: The results showed increase in fertilization, two cell embryos and blastocysts in CP+Cr group compared to those of the CP group ($P<0.05$). Also, the crocin in CP+Cr group prevented the increase of total number of arrested embryos and percentage of arrested embryos type I, II, and III ($P<0.05$). Decrease in MDA assay and sperms with damaged DNA were observed more in CP+Cr group ($P<0.05$).

Conclusion: This study showed the efficiency of crocin in amelioration of fertility and growth of primitive embryo in animals that received CP.

Keywords: Cyclophosphamide, crocin, DNA damage, in vitro fertilization, malondialdehyde

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(114): 49-59 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۸ آبان سال ۱۳۹۳ (۵۹-۴۹)

ارزیابی اثر محافظتی کروسین بر آسیب DNA اسپرم و لقاح داخل آزمایشگاهی موش های نر بالغ تحت درمان با سیکلوفسفامید

زهرا بختیاری[۱]
رسول شهروز[۲]
عباس احمدی[۳]
فرهاد سلطانعلی نژاد[۳]

چکیده

سابقه و هدف: استرس اکسیداتیو ناشی از عوارض جانبی شیمی درمانی با سیکلوفسفامید موجب آسیب‌پذیری اسپرماتوزوئیدها و کاهش توان باروری می‌شود. لذا در این مطالعه تأثیر کروسین (عصاره زعفران) بر بهبود این عوارض بررسی شد.

مواد و روش‌ها: موش سوری نر بالغ در ۳ گروه مساوی قرار گرفتند. گروه کنترل سرم فیزیولوژی (۰/۲^{cc},day,IP)، گروه سیکلوفسفامید CP (۱۵mg/kg/week,IP) و گروه سیکلوفسفامید+کروسین (CP+Cr) علاوه بر سیکلوفسفامید روزانه کروسین (۲۰۰mg/kg/day,IP) را به مدت ۳۵ روز دریافت نمودند. سپس حیوانات آسان کشی شده و میزان مالون دی آلدئید بیضه‌ها اندازه‌گیری شد. پس از استحصال اسپرم از دم اپیدیدیم میزان شکسته شدن DNA توسط رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج محاسبه شد. پس از تحریک تخمک‌گذاری در تعداد ۷۲ سر موش ماده بالغ، تخمک‌های جدا شده در محیط کشت HTF حاوی BSA مورد لقاح داخل آزمایشگاهی با اسپرم‌های ظرفیت یافته قرار گرفتند. میزان لقاح و رشد جنینی گروه‌ها طی ۱۲۰ ساعت ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج بررسی درصد لقاح داخل آزمایشگاهی اسپرم‌ها نشان از افزایش لقاح، جنین‌های دوسلولی و بلاستوسیست‌ها در گروه CP+Cr نسبت به گروه CP داشت ($p<۰/۰۵$). هم‌چنین کروسین در گروه CP+Cr توانست از افزایش تعداد کل جنین‌های متوقف شده و درصد جنین‌های متوقف شده تیپ I و II و III در مقایسه با گروه CP جلوگیری نماید ($p<۰/۰۵$). کاهش میزان مالون دی‌آلدئید و اسپرم‌های با DNA آسیب دیده نیز در گروه CP+Cr نسبت به گروه CP مشاهده شد($p<۰/۰۵$).

استنتاج: نتایج این مطالعه توانایی کروسین در بهبود توان باروری و روند رشد جنین اولیه در حیوانات دریافت کننده سیکلوفسفامید را نشان داد.

واژه های کلیدی: سیکلوفسفامید، کروسین، آسیب DNA، لقاح داخل آزمایشگاهی، مالون‌دی آلدئید

مقدمه

با افزایش تعداد افراد جوانی که از سرطان جان سالم به در برده‌اند، احتمال بروز ناباروری نگرانی عمده بیماران را سبب شده است(۱). سیکلوفسفامید به عنوان یکی از رایج‌ترین داروهای مورد استفاده در شیمی

مولف مسئول: زهرا بختیاری– کرمانشاه: فرهنگیان فاز ۲، ایستگاه ۵، کوی دانشگاه، پلاک E-mail:sara_bakhtiari1@yahoo.com
۱. کارشناسی ارشد بافت شناسی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲. دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳. استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۴/۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۷/۹ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۸/۱۰

درمانی، علاوه بر فعالیت‌های ضدسرطانی خود به واسطه متابولیت سایتوتوکسیک اصلی اش یعنی فسفور آمیدموستارد(۲)، با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) در داخل‌سلول و ایجاد استرس‌اکسیداتیو اختلالات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی زیادی را در پی خواهد داشت(۵-۳) که نهایتاً منجر به کاهش باروری در افراد تحت درمان می‌شود(۷،۶).

مطالعات صورت گرفته نشان دادند که ۲۵ الی ۴۵ درصد مردان نابارور دارای سطوح بالایی از ROS در نمونه‌های مایع منی خود بوده‌اند(۹،۸). علاوه بر این نقش سیکلوفسفامید در بروز الیگواسپرمی و آزواسپرمی(۱۰) و نیز حذف چرخه‌های اسپرماتوژنیک(۶) در مردان بالغ تحت درمان با این دارو به اثبات رسیده است به طوری که بازگشت باروری در این بیماران غیرقابل پیش‌بینی بوده و در برخی موارد سال‌ها به طول می‌انجامد(۱۱). بررسی‌های آزمایشگاهی صورت گرفته، نقش آنتی اکسیدانت‌ها را در کاهش تولید ROSتوسط اسپرم و بهبود توانایی تکاملی جنین مورد تأیید قرار داده‌اند(۱۴-۱۲)، از این روی با توجه به کاربرد روزافزون تکنیک‌های آزمایشگاهی نظیر IVF، ارزیابی سطوح ROS و نیز استفاده از آنتی اکسیدانت‌های مؤثر و کارا می‌تواند ما را به نتایج بهینه رهنمون سازد، هم چنان‌که تحقیقات صورت گرفته نشان داده‌اند که این ترکیبات قادرند اثرات سمی پراکسید هیدروژن بر روی جنین را به نحو مطلوبی کاهش دهند(۱۵). زعفران یا سافرون یکی از گیاهان دارویی است که در ایران به میزان فراوان کشت داده می‌شود. مطالعات داروشناسی نشان داده‌اند که کروسین (عصاره زعفران) دارای خواص درمانی متعددی از جمله اثرات ضدتوموری(۱۸-۱۶)، ضدتشنج(۱۹)، ضددرد و التهاب(۲۰) و کاهش دهنده چربی خون می‌باشد(۲۲،۲۱). لذا در این مطالعه از کروسین که یکی از مواد اصلی موثر در زعفران با خواص آنتی اکسیدانتی و از بین برنده رادیکال‌های آزاد می‌باشد(۲۳)، به منظور بهبود عوارض ناشی از سیکلوفسفامید بر توان باروری حیوانات آزمایشگاهی تحت درمان با این دارو استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، تعداد ۲۴ سر موش سوری نر نژاد NMRI بالغ (۶تا۸ هفته‌ای) ۲۰ تا ۲۵ گرمی که قبلاً از توانایی باروری آن‌ها از طریق قرار دادن آن‌ها در کنار موش‌های ماده اطمینان حاصل شده بود، در شرایط استاندارد با دمای ۲ ± ۲۲درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۳۰ تا ۶۰ درصد و با سیکل نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند. سپس به طور تصادفی در ۳ گروه ۸ تایی با دوره درمانی ۳۵ روز(طول دوره جنسی موش سوری نر) قرار گرفتند:

۱- گروه کنترل به طور روزانه سرم فیزیولوژی ($۰/۲^{cc}$,IP) دریافت نمودند.

۲- گروه CP سیکلوفسفامید (۱۵mg/kg/week,IP) دریافت کردند.

۳- گروه CP+Cr به همراه سیکلوفسفامید مشابه گروه CP ، کروسین (۲۰۰mg/kg/day,IP) را نیز دریافت نمودند.

نحوی تهیه داروها

ویال ۵۰۰ میلی‌گرمی سیکلوفسفامید (Baxter, Germany) تهیه شد و در ۵۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل و مقدار دارو(۱۵mg/kg/week, IP) برای هر موش در حجم ۰/۱ میلی لیتر محاسبه گردید(۲۴). مقدار کروسین موثر در موش‌های سفید آزمایشگاهی (۲۰۰mg/kg) می‌باشد(۲۵). جهت تهیه آن ۲۰۰mg از پودر کروسین (SIGMA-USA-ALDRICH-17304) را در ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل کرده و مقدار داروی تزریقی برای هر موش ۰/۲ میلی لیتر به دست آمد.

بررسی قابلیت باروری آزمایشگاهی (IVF)

در پایان دوره درمان، موش‌های سوری ماده بالغ جوان آماده تحریک تخمک گذاری شدند. به‌ازای هر

موش نر ۳ موش ماده در نظر گرفته شد. تحریک تخمک‌گذاری با استفاده از تزریق ۱۰ واحد هورمون PMSG (ساخت شرکت Folligon، هلند) و۴۶تا۴۸ ساعت بعد تزریق ۱۰ واحد هورمون HCG (ساخت شرکت Folligon، هلند) به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر به روش داخل صفاقی صورت گرفت.روز پیش از لقاح، محیط کشت‌های لازم آماده شد و جهت به تعادل رسیدن ۱۲ ساعت قبل از لقاح در انکوباتور با ترکیب گازی ۵ درصد CO2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. دیش‌های لقاح با محیط کشت HTF که با ۴ mg/ml BSA (sigma) ترکیب شده بود، قطره‌گذاری شدند. یک قطره ۵۰۰ میکرولیتری در هر دیش برای لقاح و چندین قطرهٔ ۱۰۰ میکرولیتری برای شست و شو و کشت در دیش‌های استریل گذاشته و روی سطح آن‌ها با روغن معدنی (Mineral oil, sigma) پوشانده شد. ۱۰ تا ۱۲ ساعت پس از تزریق HCG، موش‌های ماده آسان‌کشی شدند. پس از قرار گرفتن لوله‌های رحمی در محیط کشت ۳۷ درجه، با استفاده از تکنیک Dissecting تخمک‌ها خارج و بعد از شست و شو به قطرات محیط لقاح در زیر روغن معدنی حاوی محیط کشت HTF و ۴mg/ml BSA منتقل شدند. سپس موش‌های نر آسان کشی شدند و پس از ایجاد چند برش دردم اپیدیدیم درون پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشتHTF، با استفاده از روش شناورسازی(Swim up) به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور اسپرم‌ها خارج و بعد از بررسی اسپرم‌ها جهت توانایی به مدت ۱ ساعت داخل انکوباتور تا زمان انجام لقاح قرار داده شدند. پس از آن اسپرم‌های متحرک، به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت، اضافه شدند. حدود ۵ تا ۶ ساعت بعد ، عمل لقاح با مشاهده دو پیش‌هسته انجام شد. بدین ترتیب زیگوت‌های به دست آمده بعد از شست و شو در داخل قطرات۱۰۰ میکرولیتری در زیر روغن معدنی به مدت ۱۲۰ ساعت کشت داده شدند(۲۶). ۲۴ ساعت پس از کشت تعداد جنین‌های دوسلولی و۱۲۰ ساعت بعد از کشت تعداد بلاستوسیست‌ها و جنین‌های متوقف شده در هر گروه در زیر میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی میزان آسیب DNA اسپرم، پس از تهیه اسمیر از نمونه‌های اسپرم به دست آمده از دم اپیدیدیم و خشک‌شدن آن‌ها، لام‌ها به مدت ۲ ساعت توسط محلول کارنوی فیکس گردید و بعد به مدت ۱۰ دقیقه توسط رنگ‌آمیزی آکریدین‌اورنج رنگ‌آمیزی شدند. پس از شست و شو با آب، لام‌ها با میکروسکوپ فلورسنت و فیلتر ۴۶۰ nm بررسی و نتایج نیز در قالب درصد بیان شد(۲۷).

در پایان با استفاده از عصاره بافتی حاصل از هموژن کردن بیضه‌ها آزمایش تعیین میزان مالون‌دی‌آلدئید انجام شد. یکی از محصولات جانبی پراکسیداسیون لیپیدی، مالون دی آلدئید است که جهت برآورد میزان آسیب پراکسیداتیو کاربرد دارد. برای این منظور ۰/۳ -۰/۲ گرم از نمونه‌ها در کلرید پتاسیم خنک (۱۵۰ mM) هموژنه شده و سپس ترکیب حاصل در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. ۰/۵ میلی‌لیتر از ماده رویی با ۳ میلی لیتر اسیدفسفریک (V/V ۱ درصد) مخلوط شد سپس اوسط ورتکس (Supernatant) Vortex، ۱ میلی‌لیتر (۶/۷TBA g/L) به نمونه‌ها اضافه شد. نمونه‌ها برای مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس در یخ سرد شدند. پس از افزودن ۳ میلی‌لیتر ان- بوتانول، نمونه ها مجدا به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مقدار جذب ماده رویی (Vortex) به وسیله اسپکتروفتومتری در ۵۳۲ نانومتر و بر اساس منحنی کالیبراسیون استاندارد MDA محاسبه گردید و در نهایت مقدار مالون دی‌آلدئید به صورت نانومول در هر میلی‌گرم پروتئین بیان شد(۲۸). میزان پروتئین نمونه‌ها نیز بر اساس روش لوری مورد اندازه گیری قرار گرفت(۲۹). داده‌های به دست آمده از بررسی میزان مالون دی آلدئید بیضه و آسیب DNA اسپرم توسط نرم‌افزار SPSS[1] و به روش آماری

1. Statistical Package for Social Sciences (SPSS)

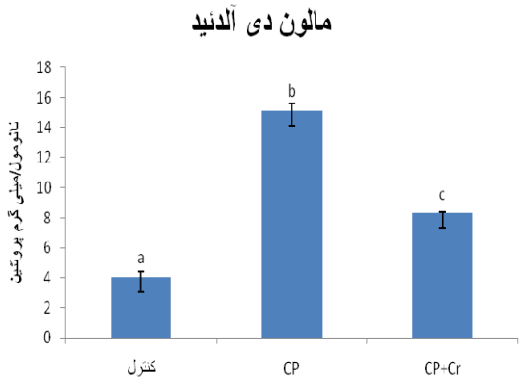
آنووا[1] و آزمون دانکن[2] درسطح (p <۰/۰۵) مورد آنالیز آماری قرار گرفت. هم‌چنین داده‌های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی گروه‌ها با استفاده از نرم افزار مینی تب[3] و روش توپروپرشن[4] آنالیز شدند.

یافته ها

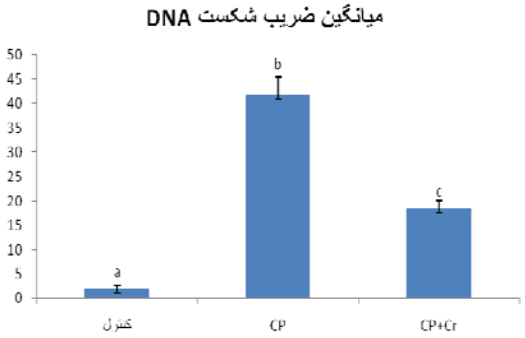
نتایج اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدئید بافت بیضه مشخص کرد که مقادیر این پارامتر در گروه CP+Cr (۰/۱۱ ± ۸/۳ نانومول بر میلی‌گرم پروتئین) کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه CP (۰/۵± ۱۵/۱ نانومول بر میلی‌گرم پروتئین) نشان داد (p <۰/۰۵) (نمودارشماره۱). هم‌چنین افزایش معنی‌دار میانگین درصد اسپرم‌های با DNA آسیب دیده در گروه CP (۳/۷۵±۴۱/۷۵) در مقایسه با گروه کنترل (۰/۷۱±۲) و CP+Cr (۱/۵۵±۱۸/۵) مشاهده شد(p<۰/۰۵) (نمودار شماره ۲).

محل قرارگیری نمودار شماره ۱ نتایج حاصل از بررسی درصد لقاح داخل آزمایشگاهی اسپرم‌ها نشان داد که تجویز سیکلوفسفامید باعث کاهش معنی‌دار درصد لقاح از ۹۳/۳۷ در گروه کنترل به ۷۵/۶۷ در گروه CP شده است که نشان از کاهش قدرت باروری اسپرم‌ها توسط سیکلوفسفامید دارد. تجویز توأم کروسین به همراه سیکلوفسفامید در گروه CP+Cr باعث بهبود آسیب‌های ایجاد شده توسط سیکلوفسفامید بر توان باروری شده است که باعث افزایش معنی‌دار درصد لقاح در مقایسه با گروه CP به ۸۶/۸۸ درصد در این گروه شده است (p <۰/۰۵).

حروف غیر متشابه در نمودارها نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد (p <۰/۰۵). مقایسه درصد جنین‌های دوسلولی ایجاد شده که نشان‌دهنده شروع شکافتگی است مشخص کرد که تجویز سیکلوفسفامید باعث کاهش معنی‌دار درصد این جنین‌ها از ۸۷ در گروه کنترل به ۷۵ در گروه CP شده است که تجویز توام کروسین به همراه سیکلوفسفامید در گروه CP+Cr باعث افزایش معنی‌دار درصد جنین‌های دو سلولی نسبت به گروه CP به میزان (۹۰/۵۷) گردید (p <۰/۰۵).



نمودارشماره۱: مقایسه میزان مالون دی آلدئید در گروه‌های مختلف (Mean+Se)



نمودارشماره۲: بررسی درصد میانگین شکست DNA در گروه های آزمایشی

بررسی جنین‌هایی که پس از ۱۲۰ ساعت به مرحله بلاستوسیست رسیده بودند مشخص کرد که سیکلوفسفامید باعث کاهش این پارامتر از ۶۶/۸۶ درصد در گروه کنترل به ۱۷/۸۶درصد در گروه CP شده است در حالی که در گروه CP+Cr افزایش بلاستوسیست‌ها به طور معنی‌دار به میزان ۶۶/۰۳ درصد مشاهده شد (p <۰/۰۵).

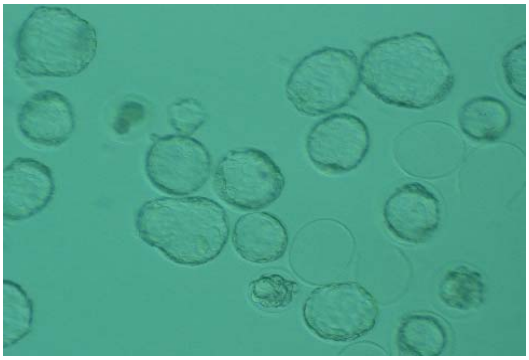
1. ANOVA
2. Duncan
3. Minitab
4. Two Propertion

افزایش درصد تعداد کل جنین‌های متوقف‌شده در گروه CP (۸۲/۱۴) در مقایسه با گروه کنترل(۳۳/۱۳) و CP+Cr (۳۳/۹۶) مشاهده شد که این افزایش در گروه CP با گروه‌های کنترل و CP+Cr معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$). درصد جنین‌های متوقف شده تیپ I (دارای بلاستومرهای لیز، فراگمانته شدن و نکروتیک بودن کامل) افزایش معنی‌داری در گروه CP (۱۱/۶) نسبت به گروه‌های کنترل (۱/۱۸) و CP+Cr (۱/۸۸) نشان داد ($p < ۰/۰۵$).

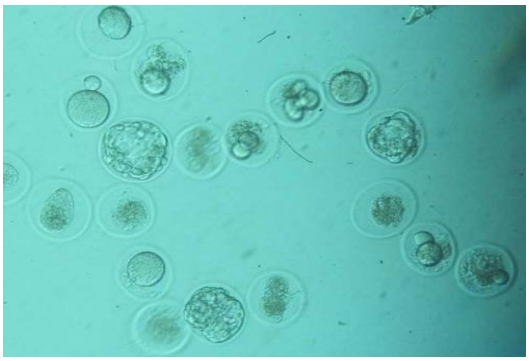
هم‌چنین درصد جنین‌های متوقف شده تیپ II (لیز و فراگمانته شدن در تعدادی از بلاستومرها) و III (دارای تعداد کمی بلاستومرهای لیز و فراگمانته و وزیکول سیتوپلاسمی) نیز در گروه CP افزایش معنی‌داری با سایر گروه‌ها داشت که حضور کروسین در گروه CP+Cr باعث کاهش معنی‌دار این پارامترها در مقایسه با گروه CP گردید ($p < ۰/۰۵$) (جدول شماره۱) (تصاویر شماره ۱ تا ۳).

بحث

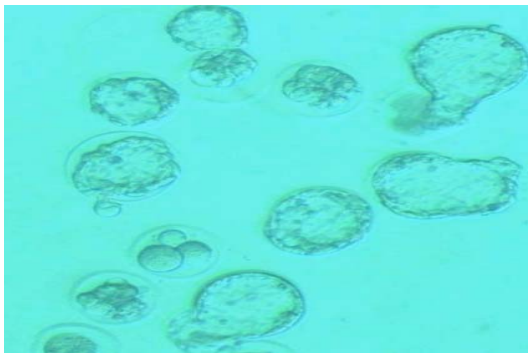
کاهش میزان باروری و کیفیت جنین با میزان فراوانی DNA های آسیب دیده اسپرم، ارتباط مستقیم دارد(۳۰). هم چنین ارتباط مستقیمی بین درصد لقاح داخل آزمایشگاهی و میزان آسیب DNA اسپرم وجود دارد. در صورت آسیب شدید DNA اسپرم درصد لقاح به شدت کاهش می‌یابد(۳۱). علاوه بر این استرس اکسیداتیو، بروز شکست در یک یا هر دو رشته DNA را افزایش می‌دهد(۳۲). طولانی مدت سیکلوفسفامید به طور معنی‌داری میزان شکستگی‌های رشته DNA و اتصالات عرضی DNA-DNAرا در اسپرم رت‌های تحت درمان افزایش می‌دهد(۳۳). مطالعات انجام شده بر روی انسان نیز اثر منفی آسیب DNA اسپرم را بر روی تکامل جنین در روند لقاح خارج رحمی تأیید کرده‌اند(۳۴). هم‌چنین گزارشات دیگری نیز بر نقش آنتی‌اکسیدانت‌ها در کاهش آسیب DNA و نیز افزایش میزان باروری و لانه‌گزینی بالینی صحه گذارده‌اند(۳۶،۳۵). بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که کاهش معنی‌دار میزان



تصویر شماره ۱: گروه کنترل، درصد بالایی از جنین ها به مرحله بلاستوسیست رسیده و بلاستوسیست های حاصله کیفیت مناسبی از نظر مورفولوژی دارند.



تصویر شماره ۲: گروه CP، درصد بالایی از جنین ها در مراحل مختلف رشد متوقف شده اند وتنها درصد کمی از جنین ها به مرحله بلاستوسیست رسیده اند. بلاستوسیست های حاصله از نظر مورفولوژی کیفیت مناسبی ندارند و جنین های متوقف شده اکثراً تیپ I و II می باشند.



تصویر شماره ۳: گروه CP+Cr، درصد بالایی از جنین ها به مرحله بلاستوسیست رسیده وبلاستوسیست های حاصله کیفیت مناسبی از نظر مورفولوژی درمقایسه با گروه CP دارند. درصد کمی ازجنین‌ها متوقف شده اند و اکثر جنین های متوقف شده از نوع تیپ II و III هستند.

جدول شماره۱: میانگین نتایج حاصل از بررسی لقاح داخل آزمایشگاهی و روند رشد جنینی در گروه های مختلف مورد مطالعه(a وجود اختلاف معنی دار با گروه کنترل، b وجود اختلاف معنی دار با گروه CP)

گروه‌ها	تعداد اووسیت	میزان لقاح (%)	جنین‌های دوسلولی (%)	بلاستوسیست (%)	کل جنین های متوقف شده (%)	جنین‌های متوقف شده نوع| (%)	جنین های متوقف شده نوع || (%)	جنین‌های متوقف شده نوع ||| (%)
کنترل	۱۸۱	۹۳/۳۷	۸۷	۶۶/۸۶	۳۳/۱۳	۱/۱۸	۴/۱۴	۲۷/۸۱
CP	۱۴۸	[a]۷۵/۶۷	[a]۷۵	[a]۱۷/۸۶	[a]۸۲/۱۴	[a]۱۱/۶	[a]۱۴/۲۹	[a]۵۶/۲۵
CP+Cr	۱۲۲	[b]۸۶/۸۸	[b]۹۰/۵۷	[b]۶۶/۰۳	[b]۳۳/۹۶	[b]۱/۸۸	[b]۵/۶۷	[b]۲۶/۴۱

لقاح، رویان‌های دوسلولی، بلاستوسیست و به طور کلی کاهش میزان باروری در حیوانات تحت درمان در گروه CP نسبت به سایر گروه‌ها، به دلیل عمل متابولیت سیکلوفسفامید به نام فسفورآمیدموستارد در ایجاد اتصالی متقاطع در بین دو رشته DNA (۳۷) می‌باشد، در حالی که کروسین با تأثیرات محافظتی خود بر کاهش میانگین درصد شکست DNA اسپرم موجب افزایش معنی‌دار درصد باروری در گروه CP+Cr نسبت به گروه CP گردید. یکی دیگر از علل مهم پایین بودن درصد تولید جنین در شرایط آزمایشگاهی، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) است که تصور می‌شود این عامل در توقف تقسیم میوزی اووسیت(۳۸)، توقف رشد جنین و مرگ سلولی دخالت داشته باشد(۳۹). ROSتولیدشده توسط اسپرم‌ها با کیفیت مایع منی و نیز توانایی بارورسازی اسپرم در شرایط آزمایشگاهی ارتباط عکس دارد(۴۰). ROS به اسیدهای چرب غیراشباع که در غشاء سلولی حضور دارند حمله کرده و موجب شروع مجموعه ای از واکنش‌های شیمیایی تحت عنوان پراکسیداسیون لیپیدی می گردد(۴۲،۴۱). اسپرم‌ها حساسیت ویژه‌ای نسبت به آسیب های ناشی از استرس اکسیداتیو دارند چرا که غشاء پلاسمایی آن ها دارای مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع بوده و در سیتوپلاسم آن ها میزان اندکی آنزیم‌های مهاری وجود دارد(۴۴،۴۳). این در حالی است که بررسی‌ها نشان داده‌اند آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از سیکلوفسفامید به واسطه تولید پراکسید هیدروژن روی می‌دهند(۴۵). یکی از محصولات جانبی پراکسیداسیون لیپیدی، مالون‌دی‌آلدئید می‌باشد. این محصول جانبی در ارزیابی‌های بیوشیمیایی متعددی جهت برآورد میزان آسیب پراکسیداتیو کاربرد دارد(۴۶). لذا نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقادیر مالون‌دی‌آلدئید در بافت بیضه گروه‌های آزمایشی که بیانگر افزایش معنی‌دار این پارامتر در گروه CP در مقایسه با سایر گروه‌ها می‌باشد خود به عنوان عاملی مهم و تأثیرگذار در کاهش درصد باروری این گروه به‌حساب می‌آید. یکی از دلایل مهم این امر مطابق مطالعات صورت گرفته این است که عملکردهای مهم اسپرم از جمله ظرفیت یابی، واکنش آکروزومی، اتصال به زوناپلوسیدا و نفوذ به تخمک مستلزم وجود میزان طبیعی ROS می‌باشد(۴۸،۴۷). پس می‌توان افزایش معنی‌دار درصد باروری در گروه CP+Cr نسبت به گروه CP را به نقش آنتی‌اکسیدانتی کروسین در سرکوب ROS تولیدشده(۴۹) توسط سیکلوفسفامید نسبت داد. مطالعات گذشته نقش آنتی‌اکسیدانتی کروسین در بهبود بیماری‌هایی مانند دیس لیپیدمیا و آترواسکلروز نشان می‌دهد(۵۰). در مطالعه دیگری سافرون و اجزای فعالش (کروسین و سافرانال) توانستند جراحت lschemia-Reperfusion ایجاد شده در بافت مغز و کلیه را کاهش دهند(۵۱). هم چنین در یک بررسی تاثیر کروسین به عنوان یک عامل ضد آترواسکلروز در بلدرچین‌ها مشخص گردید(۵۲). در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد که کروسین از طریق کاهش معنی‌دار میزان مالون‌دی‌آلدئید موجب بهبود عملکرد اسپرم در لقاح موفقیت‌آمیز با تخمک می گردد.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که کروسین به علت داشتن خاصیت آنتی اکسیدانتی می‌تواند به طور معنی‌دار احتمال باروری را در حیوانات تحت درمان با سیکلوفسفامید افزایش دهد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه تحت عنوان "مطالعه بافت شناسی بیضه و ارزیابی پارامترهای باروری در موش‌های سوری تحت درمان با سیکلوفسفامید و نقش محافظتی کروسین و اتیل پیروات" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۲ می‌باشد که با حمایت بخش بافت شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه اجرا شده است.

References

1. Kenny LB, Laufer MR, Grant FD, Grier H, Diller L. High risk of infertility and long term gonadal damage in males treated with high dose cyclophosphamide for sarcoma during childhood. Cancer 2001; 91(3): 613-621.
2. Boyd VL, Robbins JD, Egan W, Ludeman SM. 31P Nuclear magnetic resonance spectroscopic observation of the intracellular transformations of oncostatic cyclophosphamide metabolites. J Med Chem 1986; 29(7): 1206-1210.
3. 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): 201-207.
4. Ghosh D, Das UB, Misro M. Protective role of alpha-tocopherol- succinate (provitamin-E) in cyclophosphamide induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders: a correlative approach to oxidative stress. Free Radic Res 2002; 36(11): 1209-1218.
5. Manda K, Bhatia AL. Prophylactic action of melatonin against cyclophosphamide-induced oxidative stress in mice. Cell Biol Toxicol 2003; 19(6): 367-372.
6. Howell S, Shalet S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. Endocrinol Metab Clin North Am 1998; 27(4): 927-943.
7. Chapman RM. Gonadal injury resulting from chemotherapy. Am J Ind Med 1983; 4(1-2): 149-161.
8. de Lamirande E, Leduc BE, Iwasaki A, Hassouna M, and Gagnon C. Increased reactive oxygen species formation in semen of patients with spinal cord injury. Fertil Steril 1995; 64(3): 637-642.
9. Padron OF, Brackett NL, Sharma RK, Lynne CM, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Seminal reactive oxygen species, sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. Fertil Steril 1997; 67(6): 1115-11120.
10. Qureshi MS, Pennington JH, Goldsmith HJ, Cox PE. Cyclophosphamide therapy and sterility. Lancet 1972; 2(7790): 1290-1291.
11. Buchanan JD, Fairley KF, Barrie JU. Return of spermatogenesis after stopping cyclophosphamide therapy. Lancet 1975; 2(7926): 156-157.
12. Tatemoto H, Ootaki K, Shigeta K, Muto N. Enhancement of developmental competence after in vitro fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside during in vitro maturation. Biol Reprod 2001; 65(6): 1800-1806.
13. Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. Theriogenology 2003; 59(3-40): 939-949.
14. Esfandiari N, Falcone T, Agarwal A, Attaran M, Nelson DR, Sharma RK. Protein supplementation and the incidence of apoptosis and oxidative stress in mouse

embryos. Obstet Gynecol 2005; 105(30): 653-660.

15. Zhang X, Sharma RK, Agarwal A, Falcone T. Effect of pentoxifylline in reducing oxidative stress-induced embryotoxicity. J Assist Reprod Genet 2005; 22(11-12): 415-417.
16. Nair SC, Pannikar B, Panikar KR, Antitumour activity of saffron (Crocus sativus). Cancer Lett 1991; 57(2): 109-114.
17. Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M, Fernandez JA. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (Crocus sativus L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. Cancer Lett 1996; 100(1-2): 23-30.
18. Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (Crocus sativus L.). Exp Biol Med 2002; 227(1): 20-25.
19. Hosseinzadeh H, Khosravan V. Anticonvulsant effects of aqueous and ethanolic extracts of Crocus sativus L. stigmas in mice. Arch Intern Med 2002; 5: 44-47.
20. Hosseinzadeh H, Younesi HM. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice, BMC Pharmacol. 2002; 2: 7.
21. He SY, Qian ZY, Tang FT, Wen N, Xu G-L, Sheng L. Effect of crocin on experimental atherosclerosis in quails and its mechanisms. Life Sci 2005; 77(8): 907-921.
22. Lee IA, Lee JH, Baek NI, Kim DH. Antihyperlipidemic effect of crocin isolated from the fructus of Gardenia jasminoides and its metabolite Crocetin. Biol Pharm Bull 2005; 28(11): 2106-2110.
23. Rios JL, Recio MC, Giner RM, Manez S. An update review of saffron and its active constituents. Phytotherapy Research 1998; 10(3): 189-193.
24. Selvakumar E, Prahalathan C, Sudharsan PT, and Varalakshmi P. Protective effect of lipoic acid on cyclophosphamide-induced testicular toxicity. Clin Chim Acta 2006; 367(1-2): 114-119.
25. Hosseinzadeh H, Abootorabi A, Sadeghnia HR. Protective effect of Crocus sativus stigma extract and crocin (trans-crocin 4) on methyl methanesulfonate-induced DNA damage in mice organs. DNA Cell Biol 2008; 27(12): 657-664.
26. Nagai T, Takaba H, Miyake K, Hirabayashi Y, Yamada K. Testicular mast cells heterogeneity in idiopathic male infertility. Fertil Steril. 1992; 57(6): 1331-1336.
27. Sadeghi MR, Hodjat M, Lakpour N, Arefi S, Amirjannati N, Modarresi T, et al. Effects of sperm chromatin integrity on fertilization rate and embryo quality following intracytoplasmic sperm injection. Avicenna J Med Biotechnol 2009; 1(3): 173-180.
28. Niehaus WG Jr, Samuelsson B. Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation. Eur J Biochem 1968; 6(1): 126-130.
29. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193(1): 265-275.
30. Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Shoukir Y, et al. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. Hum Reprod 1998; 13(suppl 4): 11-19.
31. Lewis SE, Aitkcn RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. Cell Tissue Res 2005; 322(1): 33-41.

32. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. Reproduction 2001; 122(4): 497-506.
33. Qiu J, Hales BF, Robaire B. Damage to rat spermatozoa DNA after chronic cyclophosphamide exposure. Biol Reprod 1995; 53(6): 1465-1473.
34. Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. Fertil Steril 2002; 82(2): 378-383.
35. Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation human sperm DNA integrity. Hum Reprod 1998; 13(5): 1240-1247.
36. Greco E, Romano S, Iacobelli M, Ferrero S, Baroni E, Minasi MG, et al. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. Hum Reprod 2005; 20(9): 2590-2594.
37. Arumugam N, Silvakumar V, Thanislass J, and Devaraj H. Effects of acrolein on rat liver antioxidant defense system. Indian J Exp Biol 1997; 35(12): 1373-1374.
38. Nakamura Y, Nagamata Y, Sugino N, Takayama H, Kato H. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. Biol Reprod 2002; 67(5): 1588-1692.
39. Hashimoto S, Minami N, Yamada M, Imai H. Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: Relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. Mol Reprod Dev 2000; 56(4): 520-526.
40. Aitken RJ. The Amoroso lecture. The human spermatozoon a cell in crisis? J Reprod Fertil 1999; 115(1): 1-7.
41. Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. Reprod Fertil Dev 1995; 7(4): 659-668.
42. Kodama H, Kuribayashi Y, Gagnon C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. J Androl 1996; 17(2): 151-157.
43. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. Urology 1996; 48(6): 835-850.
44. Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR. Antioxidant strategies in the epididymis. Mol Cell Endocrinol 2004; 216(1-2): 31-39.
45. Murata M, Suzuki T, Midorikawa K, Oikawa S, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. Free Radic Biol Med. 2004; 37(6): 793-802.
46. De Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. Hum Reprod 1995; 10(suppl 1): 15-21.
47. De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. Rev Reprod 1997; 2(1): 48-54.
48. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. Biol Reprod 1989; 41(1): 183-197.
49. Lamirande ED, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. J Androl 1992; 13(5): 379-386.
50. Xi L, Qian Z, DU P, FU J. Pharmacokinetic properties of crocin (crocetin diagentiobiose ester) following oral administration in rats. Phytomedicine 2007; 14(9): 633-636.

51. 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. Evid Based Complement Alternat Med 2009; 6(3): 343-350.

52. He SY1, Qian ZY, Tang FT, Wen N, Xu GL, Sheng L. Effect of crocin on experimental atherosclerosis in quails and its mechanisms. Life Sci 2005; 77(8): 907-921.