

The Effect of Electroshock on Follicular Atresia in Different Stages of Estrous Cycle in Adult Mice

Rana Poozesh¹,
Mohammad Ali Hosseinpour Feizi²,
Seyed Mehdi Banan Khojasteh³,
Farzam Sheikhzadeh Hesari³

¹ MSc in animal physiology, Faculty of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran

² Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran

³ Associate Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran

(Received November 9, 2015 ; Accepted June 2, 2015)

Abstract

Background and purpose: Follicular atresia is a natural phenomenon throughout growth and development, but in excessive cases it causes disorders in the ovarian function which is the commonest cause of infertility. Outbreak of depression in women is twice as much as men. Electric-shock therapy could be used in the treatment of depression resistant to drugs. However, it has some side-effects. This research was conducted to study the effects of electric shock on ovarian follicular atresia.

Materials and methods: In this experimental study, 70 albino mice weighing 28 ± 1.5 g (9-12 weeks) with normal sex cycle were divided into 15 groups (n= 5 per group) after determining estrous cycle stages by vaginal smear. The mice were allocated into four control groups in four estrous cycle stages, four groups receiving one shock in every four stages, four groups receiving two- shocks (with interval of 4 hours) in each stage of sex cycle and two shock groups in all phases of the cycle with one and two shocks, respectively. The shock was given by a laboratory electric shock device and was tolerable for mice. The samples of ovarian tissues were stained with hematoxylin-eosin. The follicles were then examined and counted by scaled lens of a light microscope.

Results: In proestrus stage of sex cycle, a significant difference was seen between the one-shock group and other groups in mean rate of follicular atresia.

Conclusion: This study indicated that receiving shock leads to an increase in the mean rate of atretic follicles and the most negative effect was observed in the one-shock group in proestrus phase.

Keywords: Electroshock, mice, estrous cycle, follicular atresia

تاثیر الکتروشوک بر آترزی فولیکولی تخمدان در مراحل مختلف چرخه استروس موش سوری بالغ

رعنا پوزش^۱

محمدعلی حسینپور فیضی^۲

سید مهدی بانان خجسته^۳

فرزام شیخ زاده حصاری^۳

چکیده

سابقه و هدف: تحلیل رفتن فولیکولی در طی رشد آن‌ها امری طبیعی است ولی افزایش میزان آن موجب اختلال در عملکرد تخمدان می‌شود که شایع‌ترین علت ناباروری است. با در نظر گرفتن این که شیوع افسردگی در زنان دو برابر مردان است، می‌توان از الکتروشوک در درمان افسردگی مقاوم به دارو استفاده نمود. از آن جا که الکتروشوک دارای عوارضی می‌باشد، این پژوهش برای بررسی تاثیر الکتروشوک بر آترزی فولیکولی تخمدان انجام گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه پژوهشی تجربی، ۷۰ موش سوری نژاد آلبینو (وزن $28 \pm 1/5$ گرم و ۱۲-۹ هفتگی) با سیکل جنسی منظم پس از تعیین مراحل چرخه استروس با تهیه اسمیر واژن، به ۱۴ گروه ۵ تایی: چهار گروه کنترل در مراحل چهارگانه چرخه استروس، چهار گروه دریافت‌کننده یک شوک در هر یک از مراحل چهارگانه، چهار گروه با دریافت دو بار شوک (فاصله شوک‌ها ۴ ساعت) در هر مرحله چرخه جنسی و دو گروه دریافت‌کننده شوک در تمام مراحل چرخه به ترتیب یک و دو بار شوک، تقسیم شدند. اعمال شوک با دستگاه الکتروشوک آزمایشگاهی و شوک قابل تحمل برای موش‌ها صورت گرفت. مقاطع بافتی توسط هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شدند. فولیکول‌ها با صفحه مدرج میکروسکوپ نوری شمارش شدند.

یافته‌ها: در مرحله پرواستروس چرخه جنسی، از نظر آماری اختلاف بین میانگین فولیکول‌های آترتیک گروه یک شوک نسبت به گروه کنترل و گروه دو شوک و هم‌چنین نسبت به سایر گروه‌ها به طور قابل توجهی معنی‌دار بود ($p < 0/01$).
استنتاج: نتایج مطالعه نشان داد که دریافت شوک باعث افزایش میانگین آترزی فولیکول‌ها گردید و بیش‌ترین تاثیر منفی اعمال شوک در گروه یک بار شوک مرحله پرواستروس است.

واژه‌های کلیدی: الکتروشوک، موش سوری، چرخه استروس، آترزی فولیکولی

مقدمه

درصد (حدود ۵ میلیون نفر) در سراسر دنیا نابارور هستند (۱). براساس مطالعات دیگر میزان ناباروری حدود ۲۶-۱۷ درصد است و ۸۰-۶۰ میلیون زوج نابارور با رشد

ناباروری مشکل قابل توجهی در جوامع است و زندگی بسیاری از زوج‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی حدود ۱۵-۱۰

مؤلف مسئول: محمدعلی حسین پور فیضی - آذربایجان شرقی: تبریز، خیابان آزادی، نبش گلگشت، مدیریت پارک علم و فناوری E-mail: Pouefeizi@eastp.ir

۱. کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه علوم جانوری، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲. استاد، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۳. دانشیار، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۱۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۳/۹/۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۳/۱۲

سالانه ۲ میلیون نفر در سراسر جهان را شامل می‌شود (۲). در ناباروری زنان، چرخه جنسی نامنظم و اختلال در عملکرد تخمدان نقش دارند (۳). یکی دیگر از مشکلات جوامع، شیوع بالای بیماری‌های روانی از جمله اختلال افسردگی عمده (ماژور) است که با مرگ و میر قابل توجه و اختلال عملکردی همراه است (۴-۷). مطالعات اپیدمیولوژیک همواره نشان داده که میزان بیماری افسردگی در زنان نسبت به مردان بالاتر است. در واقع میزان افسردگی در زنان تقریباً دو برابر افسردگی در مردان است. میزان شیوع آن در طول زندگی برای زنان ۲۱/۳ درصد و ۱۲/۷ درصد برای مردان است (۸-۱۰). برای درمان این نوع افسردگی الکتروشوک درمانی موثرتر از دارو و در اکثر موارد تنها روش درمانی است. بنابراین حدود ۷۰ درصد از بیماران تحت الکتروشوک درمانی (ECT)، زن هستند (۱۱).

موش‌ها حیوانات پلی‌استروس بوده و چرخه جنسی آن‌ها به طور مداوم در طول سال تکرار می‌شود و شامل چهار مرحله: پرواستروس، استروس، متاستروس و دی‌استروس است. بلافاصله بعد از دی‌استروس یک چرخه، فاز پرواستروس چرخه بعدی طی می‌شود (۱۲). در تمام طول سال حیوان توانایی زاد و ولد دارد. چرخه استروس تنها در هنگام آبستنی کاذب، بارداری و شیردهی متوقف می‌شود که به این دوره آرامش باروری بین چرخه‌های استروس، Anoestrus گویند (۱۳، ۱۴). در مراحل چرخه استروس، اپی‌تلیوم واژن تغییراتی را متحمل می‌شود، بدین ترتیب که اپی‌تلیوم فلسی و شاخی می‌شود و لکوسیت‌ها ناپدید می‌شوند. ۲۴ ساعت قبل از تخمک‌گذاری، سلول‌های اپی‌تلیوم افزایش می‌یابد. فیزیولوژی تولیدمثلی موش سوری ماده بالغ شامل تخمک‌گذاری و ترشح هورمون‌های جنسی طی مراحل چرخه استروس می‌باشد (۱۴). عوامل محیطی و فیزیکی نیز در باروری موثر هستند. مشخص شده است که قرارگیری در معرض میدان‌های الکترومغناطیسی باعث وقفه تخمک‌گذاری، افزایش تراکم هسته

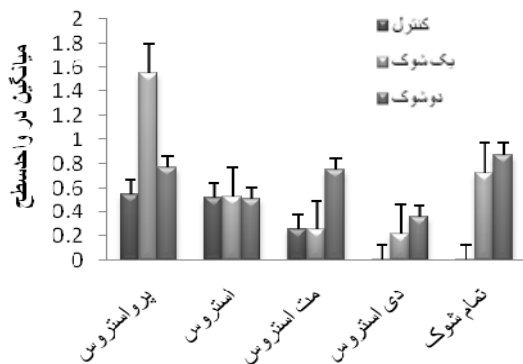
سلول‌های گرانولوزا، تغییرات مورفولوژی اووسیت و فراوانی بروز فولیکول‌های آترزی و کیستی می‌شود (۱۵). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که شوک الکتریکی در موش سوری بالغ موجب کاهش LH و FSH شده است (۱۶). ولی مطالعات اندکی در مورد تاثیر شوک الکتریکی بر آترزی فولیکولی در تخمدان با در نظر گرفتن مراحل مختلف چرخه جنسی وجود دارد. نظر به اهمیت باروری و نیاز به استفاده از الکتروشوک جهت درمان، این مطالعه به منظور بررسی تاثیر شوک الکتریکی بر میزان آترزی فولیکولی تخمدان در مراحل مختلف چرخه جنسی موش سوری ماده بالغ انجام شد تا مرحله‌ای را که کم‌تر متاثر از شوک الکتریکی است، به عنوان زمان مناسب استفاده از آن، بدون ایجاد اختلال در چرخه جنسی تعیین شود به امید آن که راه‌گشای متخصصان و محققان بالینی در مطالعات انسانی گردد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی ۷۰ موش سوری ماده بالغ (۹-۱۲ هفتگی) از محل پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه گردید و در قفس‌های استاندارد با دسترسی آزاد به آب و غذا قرار دادند و تحت شرایط دما و رطوبت ثابت، ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی به منظور حفظ ریتم بیولوژیکی پایدار نگهداری شدند. روزانه مراحل چرخه استروس موش‌ها با روش تهیه اسمیر واژینال با نمونه‌گیری از ترشحات واژن و مشاهده سلول‌های موجود در زیر میکروسکوپ نوری بر اساس نوع سلول‌ها تعیین شد (۱۲). تعیین مراحل چرخه استروس با توجه به نسبت سه نوع سلول مشاهده شده در اسمیر واژینال شامل سلول‌های اپی‌تلیال، سلول‌های فلسی (cornified) و لکوسیت صورت پذیرفت (۱۷، ۱۸). با استفاده از پیت پاستور پلاستیکی و سالی‌ن بافر فسفات ۰/۹ درصد (برای تامین محیط فیزیولوژیکی) از واژن نمونه‌ای تهیه و بر روی اسلاید شیشه‌ای خشک و تمیز منتقل گردید. بلافاصله با

یافته ها

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز داده‌های مربوط به شمارش سلولی مقاطع بافتی تخمدان، بیش‌ترین اثر تخریبی شوک و افزایش آترزی مربوط به گروه یک شوک پرواستروس در مقایسه با سایر گروه‌های مورد آزمون است. در مرحله پرواستروس چرخه جنسی، از نظر آماری فقط اختلاف بین میانگین گروه یک شوک نسبت به گروه کنترل و گروه دو شوک معنی‌دار بود ($p < 0/01$). در مرحله استروس چرخه جنسی، میانگین فولیکول آترزی برای گروه‌های شوک نسبت به گروه کنترل از نظر آماری معنی‌داری نبود. در مرحله متاستروس، از نظر آماری تنها اختلاف بین میانگین فولیکول آترزی گروه آزمایش دو بار شوک نسبت به گروه کنترل و گروه یک شوک معنی‌دار بود ($p < 0/01$). در مرحله دی‌استروس از نظر آماری میانگین فولیکول آترزی گروه دو بار شوک نسبت به گروه کنترل و گروه یک شوک اختلاف معنی‌داری نشان داد. در گروه‌های شوک دریافت کرده در تمام مراحل چرخه استروس، از نظر آماری فقط اختلاف میانگین گروه دو شوک نسبت به گروه کنترل و یک شوک معنی‌دار بود ($p < 0/05$) (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: مقایسه میانگین فولیکول‌های آترزی در تمام گروه‌های مورد آزمون، تغییرات میانگین فولیکول به صورت میانگین \pm خطای استاندارد بیان می‌شوند.

* اختلاف معنی‌دار گروه‌های تحت شوک نسبت به کنترل $p < 0/05$
اختلاف معنی‌دار بین دو گروه تحت شوک هر مرحله چرخه $p < 0/05$ نشان داده شد.

استفاده از میکروسکوپ نوری با ارزیابی سلول‌های واژن، مرحله استروس تعیین گردید (۱۹، ۱۲). موش‌ها حداقل دو دوره متوالی چرخه جنسی ۴-۵ روزه را سپری کردند و از نظر نظم مراحل سیکل جنسی اطمینان حاصل شد.

سپس موش‌ها به ۱۴ گروه تقسیم شدند. گروه ۱ الی ۴ شامل بیست سر موش در چهار مرحله چرخه استروس به عنوان گروه‌های کنترل (هر گروه به تعداد ۵ سر) قرار گرفتند. گروه‌های ۵ الی ۸ شامل بیست سر موش برای دریافت یک بار شوک در هر مرحله چرخه استروس، گروه‌های ۹ الی ۱۲ نیز با بیست سر موش، برای دریافت دو بار شوک در هر مرحله چرخه استروس (فاصله بین دو شوک ۴ ساعت) و گروه‌های ۱۳ و ۱۴ با ده سر موش، به ترتیب برای دریافت یک و دو بار شوک در تمام مراحل چرخه، موش‌ها جهت اعمال شوک در داخل دستگاه الکتروشوک سکویی به ابعاد 30×45 سانتی‌متر و با اندازه الکتروود ۱ سانتی‌متر و فاصله الکتروودی $0/2$ سانتی‌متر (ساخت شرکت قطعه آرای تبریز) با ولتاژ ورودی ۲۲۰ ولت و فرکانس ۵۰ هرتز و با خروجی قابل تنظیم قرار گرفتند (۱۶). مراحل چرخه استروس و وزن موش‌ها در طول آزمایش ثبت می‌شد. میانگین وزنی موش‌ها $28 \pm 1/5$ گرم بود. برای رعایت طول مدت هر مرحله چرخه استروس، پانزده دقیقه بعد از شوک‌دهی در هر گروه، با تشریح موش‌ها تخمدان‌ها جهت تهیه نمونه‌های بافتی برداشته شدند. مقاطع بافتی توسط هماتوکسیلین-انوزین رنگ آمیزی شدند (۲۰). شمارش فولیکول‌ها با صفحه مدرج میکروسکوپ نوری انجام شد. برای بررسی آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS و روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA)، آزمون توکی و Excel 2007 استفاده شد. با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه هر مرحله چرخه استروس در گروه‌های مورد آزمایش به طور جداگانه (گروه کنترل مرحله پرواستروس با گروه‌های آزمایش همین مرحله و...) بررسی و مقایسه شدند. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای (SE) نشان داده شده‌اند و سطح معنی‌داری کم‌تر از ۰/۰۵ تعیین گردید.

بحث

الکتریکی بر بیان زن و سنتر فاکتورهای رشددهنده سلول (۲۲-۲۴) به این صورت قابل تفسیر است که یکی از فاکتورهای موثر بر رشد فولیکولهای تخمدان فاکتور رشد شبه انسولینی (IGF) است. IGF دارای دو شکل است که شکل اصلی آن در موشها IGF-I می باشد و سنتر آن وابسته به FSH و هورمون رشد است. این فاکتور تنها پیش از تخمک گذاری فعال است و در سنتر DNA، سنتر پروتئینها و سنتر گیرنده های LH نقش دارد. نظر به کاهش هورمون FSH در مطالعات پیشین (۱۶) و کاهش هورمون رشد در برخی مطالعات در اثر اعمال شوک الکتریکی (۲۶،۲۵) عدم سنتر این فاکتور در این شرایط محتمل است. متعاقب آن افزایش آترزی فولیکولی قابل توجه است چرا که در فولیکولهای آترزی IGF-I یافت نشده است (۳). به طور کلی می توان گفت که بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، دریافت شوک باعث افزایش میانگین فولیکولهای آترزی گردید. پیشنهاد می شود مطالعات آینده به صورت بالینی و با در نظر گرفتن مراحل چرخه جنسی انجام شود.

نتایج مطالعه حاکی از آن است که اعمال شوک تنها در مراحل استروس و گروه یک شوک دی استروس چرخه جنسی تاثیری بر میانگین فولیکولی آترزی ندارد. آترزی فولیکولی در مراحل پرواستروس، دی استروس، گروه شوک تمام مراحل چرخه و دو بار شوک متاستروس افزایش میانگین قابل توجهی نشان داد. بیشترین اثر تخریبی شوک و افزایش آترزی مربوط به گروه یک شوک پرواستروس است. با توجه با این که اعمال شوک باعث کاهش قابل توجهی در میزان هورمون FSH در این مرحله گردیده است (۲۱) و آترزی فولیکولها در شرایط عادی چرخه، مربوط به فولیکولهایی است که تحت تاثیر این هورمون، در مرحله رشد فولیکولی قرار نگرفتند، اعمال شوک و کاهش FSH باعث می شود فولیکولهای بیش تری در غیاب این هورمون، دچار آترزی شوند. به نظر می رسد این تحقیق یکی از معدود پژوهشهای انجام گرفته در زمینه تاثیر شوک الکتریکی بر آترزی فولیکولی تخمدان است. نتایج حاصل با توجه به تاثیر شوک

References

1. Younesi J, Salagegheh A. Body image in fertile and infertile women. JRI 2001; 2(4): 14-21 (Persian).
2. Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W, et al. EAU guidelines on male infertility. Eur Urol 2005; 48(5): 703-711.
3. Valadan M, Ghorbani MH, Gouranorimi O. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 8th ed. Tehran: Arjmand Publication; 2011. (Persian)
4. Pincus HA, Pettit AR. The societal costs of chronic major depression. J Clin Psychiatry 2001; 62(Suppl 6): 5-9.
5. Wittchen HU, Hoyer J. Generalized anxiety disorder: nature and course. J Clin Psychiatry 2001; 62(Suppl 11): 15-19.
6. Rice DP, Miller LS. Health economics and cost implications of anxiety and other mental disorders in the United States. Br J Psychiatry Suppl 1998; 34: 4-9.
7. Wells KB, Stewart A, Hays RD, Burnam MA, Rogers W, Daniels M, et al. The functioning and well-being of depressed patients. Results from the Medical Outcomes Study. JAMA 1989; 262(7): 914-919.
8. Weissman MM, Bland R, Joyce PR, Newman S, Wells JE, Wittchen HU. Sex differences in

- rates of depression: cross-national perspectives. *J Affect Disord* 1993; 29(2-3): 77-84.
9. Kessler RC, McGonagle KA, Zhao S, Nelson CB, Hughes M, Eshleman S, et al. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* 1994; 51(1): 8-19.
 10. Weissman MM, Bland RC, Canino GJ, Faravelli C, Greenwald S, Hwu HG, et al. Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder. *JAMA* 1996; 276(4): 293-299.
 11. Rudorfer MV, Henry ME, Sackeim HA. Electroconvulsive therapy. In: *Psychiatry*. Tasman A, Kay J, Lieberman JA, (eds). 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2003. p. 1865-1901.
 12. Zarrow MX, Yochim JM, McCarthy JL. *Experimental Endocrinology: A Sourcebook of Basic Techniques*. New York, London: Academic Press; 1964.
 13. Gharagozlou MJ, Araghchian M, Shataheri SM, Radmehr B. *Animal (biology, anatomy, function and pathology)*. Publication Bijan; 2006. p. 375.
 14. Bronson FH, Dagg CP, Snell GD. Reproduction. In: *Bibliography of Techniques*. Green EL, (ed). Chapter 11. 2nd ed. New York: Dover Publications, Inc.; 1966.
 15. Soleimani Rad J, Roshanger L, Karimi Kh. Effect of electromagnetic fields on the formation process of follicle and its growth in the ovaries. *Anatomical Sciences Journal* 2002; 1(1): 47-51 (Persian).
 16. Hosseinpour Feizi MA, Karimi KH, Saebinia R, Azrfam P. Effect of sinusoidal-vibration ECT leydig cells, Sertoli cells, FSH, LH hormones. *Iranian J of Medical Sciences* 2006; 9(2): 91-95 (Persian).
 17. Parkening TA, Collins TJ, Smith ER. Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH, and prolactin in aging C57BL/6 mice at various times of the estrous cycle. *Neurobiol Aging* 1982; 3(1): 31-35.
 18. Walmer DK, Wrona MA, Hughes CL, Nelson KG. Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology* 1992; 131(3): 1458-1466.
 19. Yener T, Turkhani Tunc A, Aslan H, Aytan H, Cantug Caliskan A. Determination of oestrous cycle of the rats by direct examination: how reliable? *Anat Histol Embryol* 2007; 36(1): 75-77.
 20. Bhartiya D, Sriraman K, Gunjal P, Modak H. Gonadotropin treatment augments postnatal oogenesis and primordial follicle assembly in adult mouse ovaries? *J Ovarian Res* 2012; 5(1): 32.
 21. Pozesh R. Evaluation of the effects of electroshock on the growth ovarian follicular cells and the pituitary-ovary axis hormones in adult female mice. *Tabriz University Natural Science, Sep* 2013. p. 105.
 22. Nordanskog P, Dahlstrand U, Larsson MR, Larsson EM, Knutsson L, Johanson A. Increase in hippocampal volume after electroconvulsive therapy in patients with depression: a volumetric magnetic resonance imaging study. *J ECT* 2010; 26(1): 62-67.
 23. Altar CA, Laeng P, Jurata LW, Brockman JA, Lemire A, Bullard J, et al. Electroconvulsive seizures regulate gene expression of distinct neurotrophic signaling pathways. *J Neurosci* 2004; 24(11): 2667-2677.
 24. Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. Stress and Glucocorticoids Affect the Expression of Brain-Derived Neurotrophic

- Factor and Neurotrophin-3 mRNAs in the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, March 1995; 15(3): 1766-1777
25. Whalley LJ, Eagles JM, Bowler GM, Bennie JG, Dick HR, McGuire RJ, et al. Selective effects of ECT on hypothalamic-pituitary activity. *Psychol Med* 1987; 17(2): 319-328.
26. Fink M, Abrams R. EEG monitoring in ECT: a guide totreatment efficacy. 1998; Available from: <http://www.psychiatrictimes.com/articles/eeg-monitoring-ect-guide-treatment-efficacy>. Accessed May 2, 2014.