

Investigating the Effects of Vitamin C and Inositol on Ovarian and Uterine Damage Caused by Cisplatin in Rats

Amir Hosein Moslehi¹,
FatemeH Hoseinpour²,
Amir Saber³,
Maryam Akhavantaheri⁴,
Amir Hosein Hashemian⁵

¹ Graduated in Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran

² Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran

³ Assistant Professor, Department of Nutritional Sciences, School of Nutritional Sciences and Food Technology, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

⁴ Assistant Professor, Anatomical Science Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

⁵ Associate Professor, Department of Biostatistics, School of Health, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

(Received March 13, 2023; Accepted August 27, 2023)

Abstract

Background and purpose: Cisplatin is one of the widely used chemotherapeutics, that directly affects the ovaries and uterus leading to infertility. This study aimed to investigate the effects of inositol and vitamin C on cisplatin-induced damage to ovarian follicles and uterine histopathology.

Materials and methods: Fifty-six adult Wistar female rats were divided into eight equal groups (N=7) including negative control (oral normal saline/intraperitoneal normal saline), positive control (normal saline/cisplatin), T1 (vitamin C/cisplatin), T2 (inositol/cisplatin), T3 (vitamin C and inositol/cisplatin), T4 (vitamin C/normal saline), T5 (inositol/normal saline), and T6 (vitamin C and inositol/normal saline). The vitamin C and inositol were administered orally for 21 days. Cisplatin was injected intraperitoneally on the 15th day (7 mg/kg). On the day 22, the animals were euthanized, the uterus and ovaries removed, then the number of ovarian follicles and the uterine histopathology were examined.

Results: After cisplatin treatment, the number of healthy ovarian follicles (primordial and antral) significantly decreased ($P<0.05$) compared to the negative control group. However, all of the atretic follicles increased compared to the negative control ($P<0.05$). Treatment with vitamin C and inositol increased the number of healthy follicles, effectively reduced the number of atretic follicles, and improved the damage induced by cisplatin in the uterine tissue.

Conclusion: Treatment with vitamin C and inositol has a protective effect on the ovaries and uterus against the toxicity caused by cisplatin.

Keywords: vitamin C, inositol, cisplatin, ovarian and uterine damage, rat

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (225): 58-72 (Persian).

Corresponding Author: FatemeH Hoseinpour - Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran.
(E-mail: fhoseinpour@razi.ac.ir)

بررسی اثرات ویتامین C و اینوزیتول بر آسیب تخمدان و رحم ناشی از سیس پلاتین در موش صحرایی

امیرحسین مصلحی¹

فاطمه حسین پور²

امیر صابر³

مریم اخوان طاهری⁴

امیرحسین هاشمیان⁵

چکیده

سابقه و هدف: سیس پلاتین از پرکاربردترین داروهای شیمی درمانی است که با تاثیر مستقیم بر تخمدان و رحم می تواند باعث ایجاد ناباروری شود. در این مطالعه اثرات اینوزیتول و ویتامین C بر تعداد فولیکول های تخمدانی و هیستوپاتولوژی رحم در آسیب ناشی از سیس پلاتین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، 56 سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار به 8 گروه مساوی تقسیم شدند و به مدت 21 روز داروهای مورد مطالعه شامل ویتامین C و اینوزیتول را به صورت خوراکی دریافت کردند. گروه ها شامل کنترل منفی (نرمال سالین)، کنترل مثبت (نرمال سالین / سیس پلاتین)، تیمار 1 (ویتامین C / سیس پلاتین)، تیمار 2 (اینوزیتول / سیس پلاتین)، تیمار 3 (ویتامین C و اینوزیتول / سیس پلاتین)، تیمار 4 (ویتامین C / نرمال سالین)، تیمار 5 (اینوزیتول / نرمال سالین) و تیمار 6 (ویتامین C و اینوزیتول / نرمال سالین) تقسیم شدند. سیس پلاتین در روز 15 به میزان (7 mg/kg) به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. در روز 22 حیوانات آسان کشی شدند، رحم و تخمدان جدا و تعداد فولیکول های تخمدانی و هیستوپاتولوژی رحم بررسی گردید.

یافته ها: در مطالعه حاضر، تعداد فولیکول های تخمدان (بدوی و آنترال) در اثر سیس پلاتین نسبت به گروه کنترل منفی به شدت کاهش یافت ($P < 0/05$) و در مقابل فولیکول های آنترزی شده به نحو چشمگیری افزایش یافت ($P < 0/05$). درمان با ویتامین C و اینوزیتول، تعداد فولیکول های سالم را افزایش و آنترزی فولیکولی ناشی از سیس پلاتین را کاهش داده و آسیب القا شده در بافت رحم را بهبود بخشید.

استنتاج: درمان با ویتامین C و اینوزیتول بر سمیت ناشی از سیس پلاتین در بافت های تخمدان و رحم اثر محافظتی دارد.

واژه های کلیدی: ویتامین C، اینوزیتول، سیس پلاتین، آسیب تخمدان و رحم، موش صحرایی

مقدمه

تولید مثلی است. ناباروری نوعی بیماری در دستگاه تولید مثلی زنان و مردان است که با عدم دستیابی به

یکی از اصلی ترین مسائل انسان ها در طول تاریخ که همواره مورد توجه بوده است، مشکلات سلامتی

E-mail: fhosseinpour@razi.ac.ir

مؤلف مسئول: فاطمه حسین پور - کرمانشاه، بلوار شیخ طوسی، سه راه شهرک رسالت، دانشکده دامپزشکی

1. دکتری حرفه ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

2. استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

3. استادیار، گروه علوم تغذیه، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

4. استادیار، مرکز تحقیقات علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

5. دانشیار، گروه آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: 1401/12/22 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1402/1/20 تاریخ تصویب: 1402/6/5

حاملگی پس از 12 ماه یا بیش تر رابطه جنسی منظم و بدون محافظت تعریف می شود (1). ناباروری میلیون ها انسان را در سن باروری در سراسر جهان تحت تأثیر قرار می دهد. برآوردهای سازمان جهانی بهداشت و دانشگاه آکسفورد حاکی از آن است که حدود 48 میلیون زوج و 186 میلیون فرد در سراسر جهان با ناباروری زندگی می کنند (2-4).

ریهفات های درمانی سرطان نظیر شیمی درمانی، جراحی و پرتودرمانی، ممکن است قابلیت فرد در داشتن فرزند را در سال های پایانی زندگی از بین ببرد. پژوهش های سرطان - باروری (Oncofertility) بر حفظ باروری در هنگام درمان سرطان تکیه می کند. با پیشرفت شیوه های درمانی سرطان و افزایش شانس بهبودی بیماران مبتلا به سرطان، حفظ باروری در زنان، مردان و کودکان به موضوعی اساسی برای بیماران و خانواده های آنها تبدیل شده است (۵،۶).

به منظور حفظ باروری در افراد مبتلا به سرطان، روش های مختلفی قبل از اقدام به شیمی درمانی از جمله انجماد تخمک ها، جنین یا بخشی از تخمدان در دسترس هستند (۷،۸). با این حال این روش ها به دلیل هزینه بالا، زمان بر و تهاجمی بودن محدود هستند. از این رو، استفاده از مواد کمکی محافظتی که بتواند طی شیمی درمانی، جلوی ازدست رفتن فولیکول را بگیرد، مزایای قابل توجهی نسبت به روش های معمول خواهد داشت (9،10). در قشر تخمدان، انواع مختلفی از فولیکول های تخمدانی وجود دارد که نشان دهنده مراحل مختلف رشد و نمو و بلوغ می باشد. چهار نوع فولیکول درون تخمدان وجود دارد. فولیکول های بدوی (Primordial follicles) که میکروسکوپی هستند و نابالغ ترین و کوچک ترین فولیکول های تخمدان می باشند. اووسیت درون فولیکول بدوی با یک لایه سلول ساده مسطح احاطه شده است. فولیکول های بدوی به فولیکول های تا حدی پیشرفته تر به نام فولیکول های اولیه (Primary follicles) تبدیل می شوند. فولیکول های اولیه دارای اووسیت هایی هستند که با یک لایه سلول اپی تلیوم مکعبی در بر گرفته

شده اند؛ فولیکول های بدوی و اولیه حیوانات ماده در زمان تولد، منبع تامین فولیکول در تمام عمر حیوان هستند. هر دو این فولیکول ها (بدوی و اولیه) به فولیکول های پیشرفته تر ثانویه رشد و نمو یافته و یا تخریب می شوند. فولیکول ثانویه (Secondary follicle) نیز میکروسکوپی است و دارای دو یا چند لایه سلول فولیکولی می باشد، اما انتروم (Antrum) یا گودی ندارد. فولیکول آنترال (Antaral follicle) حفره ای پر از مایع به نام آنتروم دارد. فولیکول آنترالی که به مرحله پیش تخمک گذاری رسیده باشد، فولیکول گراف (Graaffian follicle) خوانده می شود. فولیکول آنترال از سه لایه مشخص تیکای بیرونی (Theca externa)، تیکای درونی (Theca interna) و لایه سلول های گرانولوزا (Granulosa cell layer) تشکیل شده است. تیکای بیرونی به طور عمده از یک بافت پیوندی شل تشکیل شده که به طور کامل فولیکول را دربر گرفته و آن را حمایت می کند. تیکای درونی لایه زیرین تیکای بیرونی است. سلول های تیکای درونی تحت تأثیر هورمون LH، اندروژن ها را می سازد. زیر تیکای درونی، لایه سلولی گرانولوزا وجود دارد. این لایه توسط غشای پایه (Basement membrane) از تیکای درونی جدا شده است. سلول های گرانولوزا مواد گوناگونی تولید کرده و گیرنده هورمون FSH دارند. مهم ترین مواد تولیدی این سلول ها استروژن، Inhibin و مایع فولیکولی است (۱۱،۱۲).

سیس پلاتین یک داروی شیمی درمانی موثر و از عوامل آلکیل کننده بوده که در درمان تومورهای بدخیم استفاده می شود. با این حال، استفاده از سیس پلاتین با دوز بالا، به دلیل اثرات سمی روی اندام هایی مانند تخمدان، کلیه، کبد و غیره محدودیت دارد (13-16). اعتقاد بر این است که سمیت سلولی این دارو نتیجه اتصال پلاتین به داکی ریبونوکلیئیک اسید (DNA) است. کمپلکس پلاتین - DNA، از تکثیر و رونویسی موثر DNA جلوگیری می کند. این واکنش، مسئول اثر سیتوتوکسیک سیس پلاتین است (17).

آسیب تخمدان و رحم به واسطه تجویز سیس پلاتین در مطالعات مختلفی مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعات ذکر شده که سیس پلاتین با مکانیسم‌های مختلفی موجب آسیب به تخمدان و رحم می‌شود. این اثرات ناخواسته شامل استرس اکسیداتیو، تخریب DNA اووسیت موجود در فولیکول‌های اولیه و به دنبال آن کاهش اووسیت‌ها، کاهش ذخایر تخمدان، تغییر ترشح هورمون‌ها و آپوپتوز در بافت تخمدان و رحم است که منجر به ناباروری و عوارض فراوان می‌شود (18-21). گفته شده سیس پلاتین به دلیل تولید گونه‌های فعال اکسیژن مانند آنیون سوپراکسید، رادیکال آزاد هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن، برای سلول‌های طبیعی، توکسیک می‌باشد. این گونه‌ها، اختصاصی تومورها نبوده، بلکه باعث بروز استرس اکسیداتیو سراسری در بدن می‌شوند (۲۳،۲۲).

استرس اکسیداتیو در واقع عدم تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species: ROS) و دفاع آنتی اکسیدانی می‌باشد که موجب آسیب به سیستم‌های بیولوژیک می‌شود (24). ROS ملکول‌های شیمیایی بسیار واکنش‌پذیری هستند که تمایل زیادی برای جذب الکترون دارند و به نوبه خود منجر به تولید ملکول‌های ناپایدار دیگری همچون آنیون سوپراکسید، رادیکال آزاد هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن و اکسیژن منفرد می‌شوند. میزان پایه این گونه‌ها برای عملکرد طبیعی سلول‌ها لازم می‌باشد، ولی زمانی که بیش از حد تولید شوند و یا دفاع آنتی اکسیدانی قادر به متابولیزه کردن آن‌ها نباشد، آسیب استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد (۲۶،۲۵). در مطالعات مختلف به بررسی اثرات عوامل محافظتی و آنتی اکسیدانی در آسیب تخمدان و رحم ناشی از سیس پلاتین پرداخته شده است که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد.

Pandir و همکاران در سال 2014 اثر درمانی قره گیله (bilberry) (200 mg/kg) را بر آسیب تخمدان ناشی از سیس پلاتین (7/5 mg/kg)، در موش‌های صحرایی ویستار ماده بررسی کردند. نتایج پاتولوژی نشان داد که

سیس پلاتین باعث ادم شدید، پرخونی سیاهرگی و خونریزی و نیز دژنراسیون فولیکول‌ها در تخمدان شد و این میوه توانست این عوارض را تخفیف دهد. هم‌چنین سیس پلاتین باعث القای استرس اکسیداتیو در تخمدان شد و تجویز خوراکی این میوه به مدت 10 روز باعث کاهش مالون دی‌آلدهید و افزایش سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلو تاتیون پراکسیداز در هموزنات بافت تخمدان گردید (27).

در سال 2018 اثر زینگرون (ماده موثر ریشه زنجبیل) (50 و 20 mg/kg) در موش‌های صحرایی ویستار ماده که سیس پلاتین را به صورت تک دوز 7 mg/kg دریافت کرده بودند، بررسی گردید. این ماده به مدت 7 روز به صورت خوراکی به حیوانات تجویز شد. نتایج نشان داد که زینگرون سطح سرمی FSH را کاهش داده و میزان استروژن را افزایش داد. در هیستوپاتولوژی نیز این ماده توانست ساختار و یکپارچگی بافت رحم و تخمدان را حفظ کند. ضمناً استرس اکسیداتیو ناشی از سیس پلاتین توسط زینگرون کاهش یافت. این یافته با افزایش میزان سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلو تاتیون و گلو تاتیون پراکسیداز در بافت رحم و تخمدان و نیز کاهش مالون دی‌آلدهید مشخص شد (20).

ویتامین C یک ماده مغذی شناخته‌شده و آنتی اکسیدان معروف است. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که این ویتامین با کاهش استرس اکسیداتیو توانسته ذخیره تخمدان در موش سوری را افزایش دهد و نیز آسیب وارده به تخمدان را در سندرم تخمدان پلی کیستیک تعدیل کند (28،29). هم‌چنین گفته شده درمان با ویتامین C، اثرات مضر داروهای شیمی درمانی را بر سلول‌های سرطانی کاهش می‌دهد (30). در مطالعه‌ای که اخیراً به صورت برون تنی انجام شده است نیز، ویتامین C توانست جلوی آسیب وارده به اووسیت‌های در معرض کربوپلاتین را بگیرد. به این صورت که موجب مهار آپوپتوز، آسیب وارده به DNA و نیز تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در اووسیت‌های تکثیرشده در محیط برون

تنی شود. به این ترتیب ویتامین C موجب بهبود فرآیند میوز گردید (31).

در مطالعه‌ای دیگر اثر ویتامین C و عصاره گیاه کوهوش بر سندرم تخمدان پلی کیستیک القا شده با لتروزول در موش صحرایی بررسی گردید. نتایج نشان داد که ویتامین C به تنهایی و به ویژه در ترکیب با عصاره مذکور توانست با کاهش استرس اکسیداتیو در بافت تخمدان و نیز تنظیم هورمون‌های تستوسترون و LH موجب بهبود این سندرم شود (32).

اینوزیتول یک کربوهیدرات است که در ساختارهای مختلف بدن، غذا و مکمل‌های غذایی یافت می‌شود و تحقیقات زیادی نقش این ماده را در درمان بیماری‌های مرتبط با مقاومت انسولینی مانند سندرم تخمدان پلی کیستیک، دیابت بارداری و سندرم متابولیک نشان داده است (33،34).

در مطالعه‌ای که در سال 2021 انجام شده است، گفته شده اینوزیتول در مراحل مختلف بارداری شامل بلوغ اووسیت و بارور شدن آن، ایجاد بلاستوسیت و لانه‌گزینی، رشد رویان و حتی زایمان نقش موثر دارد (35).

از آن‌جا که سندرم تخمدان پلی کیستیک از عوامل مهم ناباروری است و اینوزیتول نقش مهمی در درمان آن ایفا می‌کند، و همچنین با توجه به تایید اثرات محافظتی اینوزیتول بر بافت‌های تخمدان و رحم و نیز نقش ویتامین C در بهبود سمیت تخمدان، هدف از این مطالعه بررسی اثرات محافظتی احتمالی ویتامین C و اینوزیتول بر آسیب تخمدان و رحم ناشی از سیس پلاتین در موش صحرایی بوده است. بدین منظور تعداد دقیق انواع فولیکول‌های تخمدان مورد شمارش قرار گرفته و هیستوپاتولوژی رحم بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از 70 سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار در محدوده وزنی 190 الی 250 گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد: 12 ساعت روشنایی و

12 ساعت تاریکی، درجه حرارت 25-22 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 40 تا 60 درصد نگهداری شده و به‌طور آزادانه به غذا و آب دسترسی داشتند. پس از گذشت 7 روز به‌منظور تطابق و سازگاری حیوانات با محیط و شرایط جدید، به‌مدت 10 روز (دو دوره متوالی) اسمیرگیری شدند و موش‌های فاقد چرخه جنسی یا دارای چرخه نامنظم از آزمایش کنار گذاشته شدند. بدین ترتیب 14 سر موش صحرایی کنار گذاشته شد و 56 سر جهت انجام مداخله انتخاب گردید. این پژوهش در کمیته اخلاق دانشگاه رازی کرمانشاه با کد IR.RAZI.REC.1400.095 به تصویب رسید. حیوانات مورد آزمون به 8 گروه به‌صورت زیر تقسیم شدند و به‌مدت 21 روز تحت تیمار قرار گرفتند.

الف) گروه‌بندی حیوانات

گروه کنترل منفی: حیوانات این گروه، متناظر با گروه‌های تیمار، نرمال سالین 0/9 درصد را به‌صورت روزانه از طریق گاوژ دریافت کردند، هم‌چنین در روز 15 آزمایش، نرمال سالین 0/9 درصد را به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

گروه کنترل مثبت: حیوانات این گروه، متناظر با گروه‌های تیمار، نرمال سالین 0/9 درصد را به‌صورت روزانه از طریق گاوژ دریافت کردند، هم‌چنین در روز 15 آزمایش، سیس پلاتین با تک دوز 7 mg/kg (20) را به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

تیمار 1: حیوانات این گروه ویتامین C خوراکی را به‌صورت روزانه با دوز 150 mg/kg (28،29) از طریق گاوژ دریافت کردند، هم‌چنین در روز 15 آزمایش، سیس پلاتین با دوز 7 mg/kg را به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

تیمار 2: حیوانات این گروه اینوزیتول خوراکی را به‌صورت روزانه با دوز 420 mg/kg (36) از طریق گاوژ دریافت کردند، هم‌چنین در روز 15 آزمایش، سیس پلاتین با دوز 7 mg/kg را به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

تیمار 3: حیوانات این گروه اینوزیتول خوراکی به همراه ویتامین C خوراکی را به صورت روزانه با دوز 420 mg/kg و 150 mg/kg از طریق گاوآژ و به صورت همزمان دریافت کردند، همچنین در روز 15 آزمایش، سیس پلاتین با دوز 7 mg/kg را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

تیمار 4: حیوانات این گروه ویتامین C خوراکی را به صورت روزانه با دوز 150 mg/kg از طریق گاوآژ دریافت کردند، همچنین در روز 15 آزمایش، نرمال سالین 0/9 درصد را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

تیمار 5: حیوانات این گروه اینوزیتول خوراکی را به صورت روزانه با دوز 420 mg/kg از طریق گاوآژ دریافت کردند. همچنین در روز 15 آزمایش نرمال سالین 0/9 درصد را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

تیمار 6: حیوانات این گروه اینوزیتول خوراکی به همراه ویتامین C خوراکی را به صورت روزانه با دوز 420 mg/kg و 150 mg/kg از طریق گاوآژ دریافت کردند، هم چنین در روز 15 آزمایش نرمال سالین 0/9 درصد را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

ب) کالبدگشایی و اخذ نمونه‌ها

یک روز بعد از آخرین تیمار (روز 22)، تمامی حیوانات مجدداً توزین شده و اسمیرگیری شدند (تمامی حیواناتی که سیس پلاتین دریافت کردند شامل گروه کنترل مثبت و تیمارهای 1 تا 3 در فاز دی استروس بودند و حیوانات محدودی که در فاز دی استروس بودند (گروه کنترل منفی و تیمار 4 تا 6) از مطالعه حذف شدند). اسمیر واژنی بدین صورت در موش‌های صحرایی انجام شد: 50 میکرولیتر نرمال سالین 0/9 درصد استریل با دمای 37 درجه سانتی‌گراد به داخل واژن حیوانات تزریق و سه بار پیتاژ شد، سپس نمونه‌ها روی اسلاید شیشه‌ای قرار داده شده و لامل روی آن‌ها قرار گرفت و در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی 400 مورد بررسی قرار گرفت. سیکل تولیدمثلی یا سیکل

استروس در موش‌های صحرایی 4-5 روز به طول می‌انجامد و شامل 4 فاز می‌باشد که عبارتند از: پرواستروس، استروس، مت استروس و دی استروس. فازهای مختلف سیکل استروس براساس نسبت میان جمعیت سلول‌های اپی‌تلیال، شاخی و لوکوسیت‌ها مشخص گردید (37).

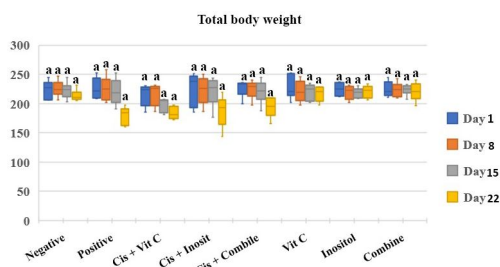
مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که در روز 22، تقریباً تمامی حیوانات در فاز دی استروس می‌باشند. در این مرحله حیوانات تحت آسان‌کشی با اتر قرار گرفتند. سپس خط میانی شکم در ناحیه تحتانی برش داده شده و تخمدان‌ها و رحم جدا شدند. بعد از پاکسازی چربی‌ها، رحم و تخمدان‌ها وزن شده و وزن مطلق این بافت‌ها و نیز نسبت وزن بافت مربوطه به وزن بدن حیوان مربوطه (وزن نسبی) و نیز ابعاد تخمدان‌ها با استفاده از کاغذ شطرنجی میلی‌متری اندازه‌گیری شد. سپس تخمدان سمت راست و قسمتی از رحم برای انجام آزمایشات پاتولوژی در فرمالین بافر 10 درصد به مدت 72 ساعت نگهداری شدند.

ج) بررسی بافت‌شناسی دستگاه تولید مثلی

تخمدان‌ها درون فرمالین تثبیت شدند. سپس در دستگاه پردازشگر بافت (Tissue processor) آب‌گیری و پس از آغشتگی در پارافین، قالب‌گیری شدند. به وسیله دستگاه میکروتوم از بلوک‌های پارافینی حاوی بافت تخمدان، برش‌های متوالی (Serial sections) با ضخامت 4 میکرون تهیه شد. برش‌ها با توالی 1 به 5 به منظور رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین (H & E) بر روی لام قرار داده شد و به کمک میکروسکوپ نوری، برش‌های بافتی از نظر کمی و کیفی، مورد بررسی قرار گرفت (۳۸،۲۰). بافت رحم نیز پس از طی فرآیند مذکور قالب‌گیری شد و سپس توسط دستگاه میکروتوم برش‌هایی با ضخامت 4 میکرون تهیه شد که پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین با کمک میکروسکوپ نوری از نظر کمی و کیفی مورد بررسی قرار گرفتند.

براساس مطالعات قبلی شمارش فولیکول‌ها به تفکیک مرحله تکامل آن‌ها در گروه‌های مورد مطالعه

همان‌طور که در نمودار شماره 1 نشان داده شده است، بین گروه‌های مورد آزمون و در زمان‌های مختلف تفاوت آماری معنی‌داری وجود ندارد ($P>0/05$).



نمودار شماره 1: وزن حیوانات در روزهای 1، 8، 15 و 22 در گروه‌های مختلف، داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SD) ارائه شده‌اند. حروف مشابه در گروه‌های مختلف نشان دهنده عدم وجود تفاوت آماری معنی‌دار است ($P>0/05$).

ب) وزن مطلق و نسبی رحم و تخمدان و اندازه تخمدان جدول شماره 1، بیانگر آن است که وزن مطلق ($P=0/001$) و نسبی رحم ($P=0/004$) و نیز وزن تخمدان ($P=0/002$) در گروه کنترل مثبت نسبت به کنترل منفی کاهش معنی‌داری یافته است. تجویز ویتامین C، اینوزیتول و یا ترکیب این دو ماده در حیواناتی که سیس پلاتین دریافت کردند (گروه‌های T1، T2 و T3)، تغییر معنی‌داری در وزن مطلق و نسبی رحم و نیز وزن تخمدان نسبت به گروه کنترل مثبت ایجاد نکرد ($P>0/05$). ضمناً تجویز ویتامین C، اینوزیتول و ترکیب این دو در حیوانات سالم (گروه‌های T4، T5 و T6)، تغییر چندانی در وزن مطلق رحم نسبت به کنترل منفی ایجاد نکرد ($P>0/05$) و این در حالی است که اینوزیتول (تیمار 5) این پارامتر را نسبت به کنترل مثبت افزایش داد ($P=0/006$). وزن نسبی رحم و وزن تخمدان در گروه‌های T4 و T5 مشابه کنترل منفی بوده ولی در گروه T6، این پارامترها نسبت به کنترل منفی پایین‌تر و سطح معنی‌داری به ترتیب $P=0/03$ و $P=0/006$ بوده است. در مورد وزن نسبی و اندازه تخمدان، هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد آزمون دیده نشد ($P>0/05$).

بررسی گردید (39). برای بررسی مورفولوژی فولیکول‌ها از لنز 10 و 40 و برای شمارش آن‌ها از لنز 40 (بزرگ‌نمایی 400X) استفاده شد.

فولیکول‌های سالم دارای سلول‌های گرانولوزای سالم و به هم فشرده با رنگ‌پذیری طبیعی و متصل به تخمک بودند و به ندرت سلول‌های گرانولوزای جدا شده با هسته‌های پیکنوتیک در آن‌ها مشاهده گردید. فولیکول‌هایی با سلول‌های گرانولوزای آسیب‌دیده و هسته‌های پیکنوتیک و تخمک نامنظم با سیتوپلاسم انوزینوفیلیک شدن شدید و واکوئله به عنوان فولیکول‌های آترزی شده شمارش شدند (41، 40). بافت رحم نیز از نظر کیفی ارزیابی شد و آرایش اپی تلیوم و غدد رحم مورد بررسی قرار گرفت.

د) آنالیز آماری

داده‌های کمی به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شدند. نرمال بودن متغیرهای کمی با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک و کولموگروف-اسمیرنف مورد بررسی قرار گرفت که در مورد اغلب متغیرها توزیع داده‌ها نرمال بوده است. در صورت نرمال نبودن (فولیکول‌های ثانویه سالم ثانویه آترزی شده و آنترال آترزی شده) با استفاده از آزمون کروسکال والیس مقایسات صورت پذیرفت و در صورت نرمال بودن، مقایسه داده‌ها در گروه‌های مورد بررسی با استفاده از آزمون تحلیل واریانس صورت پذیرفت و در صورت معنی‌دار بودن آزمون ($P<0/05$)، جهت ارزیابی تفاوت معنی‌داری آماری بین گروه‌های مورد بررسی، از پس‌آزمون شفه (Scheffe) استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه 26 استفاده شد.

یافته‌ها

الف) وزن حیوانات

تفاوت مقادیر وزن حیوانات در گروه‌های مورد بررسی با استفاده از آزمون اندازه‌های تکراری (Repeated Measurement Analysis) مورد بررسی قرار گرفت که از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P=0/279$).

جدول شماره 1: وزن مطلق و نسبی رحم و تخمدان و اندازه تخمدان (میانگین $\pm$ انحراف معیار) در پایان دوره آزمایش در گروه‌های مختلف

گروه مورد آزمایش	پارامتر	وزن مطلق رحم (میلی گرم)	نسبت وزن رحم به وزن بدن (میلی گرم بر گرم)	وزن مطلق تخمدان (میلی گرم)	نسبت وزن تخمدان به وزن بدن (میلی گرم بر گرم)	اندازه تخمدان (میلی متر عرض)
کنترل منفی		586/257 $\pm$ 37 ^a	2/1 $\pm$ 75/25 ^a	71/18 $\pm$ 0/98 ^a	0/0 $\pm$ 33/08 ^a	34/8 $\pm$ 83/61 ^a
کنترل مثبت		282/141 $\pm$ 8/14 ^b	1/0 $\pm$ 57/68 ^b	46/9 $\pm$ 0/62 ^{b,c}	0/0 $\pm$ 26/04 ^a	27/2 $\pm$ 0/74 ^a
تیمار 1: سیس پلاتین + ویتامین C		303/68 $\pm$ 5/23 ^b	1/0 $\pm$ 65/8 ^b	48/10 $\pm$ 5/88 ^{b,c}	0/0 $\pm$ 27/07 ^a	35/6 $\pm$ 33/68 ^a
تیمار 2: سیس پلاتین + اینوزیتول		284/69 $\pm$ 20/74 ^b	1/0 $\pm$ 51/2 ^b	53/9 $\pm$ 0/35 ^{b,c}	0/0 $\pm$ 28/02 ^a	39/5 $\pm$ 27/2 ^a
تیمار 3: سیس پلاتین + ترکیب ویتامین C و اینوزیتول		341/53 $\pm$ 2/85 ^b	1/0 $\pm$ 75/2 ^{b,d}	53/8 $\pm$ 4/62 ^{b,c,d}	0/0 $\pm$ 28/06 ^a	39/15 $\pm$ 46/95 ^a
تیمار 4: ویتامین C		451/132 $\pm$ 5/76 ^{a,b}	2/0 $\pm$ 07/53 ^{a,b}	68/10 $\pm$ 1/73 ^{a,d}	0/0 $\pm$ 31/04 ^a	39/8 $\pm$ 0/85 ^a
تیمار 5: اینوزیتول		529/109 $\pm$ 17/9 ^a	2/0 $\pm$ 39/48 ^{a,d}	58/13 $\pm$ 83/95 ^{a,b,c,d}	0/0 $\pm$ 26/05 ^a	35/11 $\pm$ 67/95 ^a
تیمار 6: ترکیب ویتامین C و اینوزیتول		423/147 $\pm$ 5/6 ^{a,b}	1/0 $\pm$ 92/63 ^{a,d}	50/11 $\pm$ 3/08 ^c	0/0 $\pm$ 23/06 ^a	33/3 $\pm$ 0/28 ^a

داده‌های واجد حداقل یک حرف مشترک در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت آماری معنی‌دار بوده ($P > 0/05$) و داده‌های واجد حروف نامشابه در یک ستون نمایان گر تفاوت آماری معنی‌دار بین گروه‌های مورد آزمایش می‌باشد ($P < 0/05$).

ج) تعداد فولیکول‌های سالم

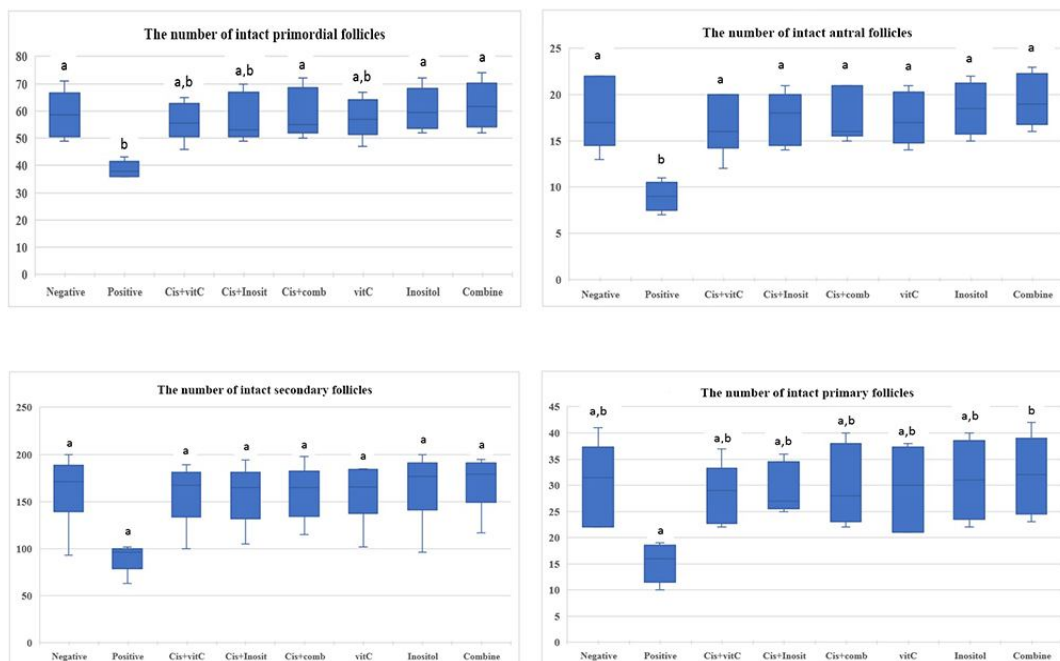
T2 و T3) و حیوانات سالم (T4، T5 و T6)، تعداد فولیکول‌های آنترال را به ترتیب با سطح معنی‌داری $P=0/002$ ، $P=0/01$ ، $P=0/009$ ، $P=0/015$ ، $P=0/03$ و $P=0/001$ نسبت به گروه کنترل مثبت افزایش داد.

انواع فولیکول‌های سالم شامل بدوی، اولیه، ثانویه و آنترال مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

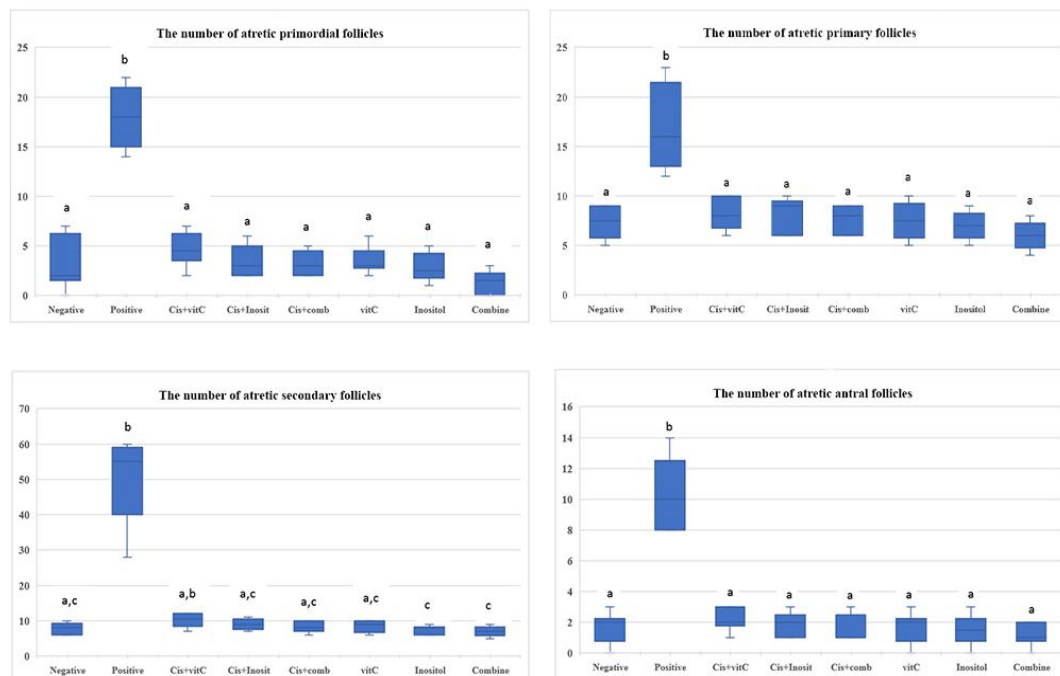
همان‌گونه که در نمودار شماره 2 نشان داده شده است، تعداد فولیکول‌های بدوی ($P=0/03$) و آنترال ($P=0/006$) در گروه کنترل مثبت نسبت به گروه کنترل منفی کاهش یافته است. اگرچه با تجویز سیس پلاتین، تعداد فولیکول‌های اولیه و ثانویه نسبت به کنترل منفی کاهش یافته است، ولی این تفاوت معنی‌دار نمی‌باشد ($P > 0/05$). تجویز ترکیب ویتامین C و اینوزیتول در حیوانات دریافت‌کننده سیس پلاتین (گروه T3)، تعداد فولیکول‌های بدوی را در مقایسه با کنترل مثبت افزایش داده است ($P=0/03$). هم‌چنین این پارامتر در گروه‌های T5 و T6 نسبت به گروه کنترل مثبت افزایش یافته است و سطح معنی‌داری به ترتیب $P=0/013$ و $P=0/006$ می‌باشد. لازم به ذکر است که تعداد فولیکول‌های بدوی در تمامی تیمارها (گروه‌های T1 تا T6) با کنترل منفی مشابه بوده است ($P=1$). تعداد فولیکول‌های اولیه در گروه T6 در مقایسه با کنترل مثبت افزایش یافته ($P < 0/05$) و در مورد این پارامتر بین سایر گروه‌های مورد آزمایش هیچ تفاوت معنی‌داری نبوده است ($P > 0/05$). هم‌چنین تعداد فولیکول‌های ثانویه در تمامی گروه‌های مورد آزمایش مشابه بوده و هیچ‌گونه تفاوت آماری معنی‌داری با هم نداشته‌اند ($P > 0/05$). تجویز ویتامین C، اینوزیتول و ترکیب این دو، در حیوانات بیمار (گروه‌های T1،

د) تعداد فولیکول‌های آنترزی شده

انواع فولیکول‌های آنترزی شده شامل بدوی، اولیه، ثانویه و آنترال مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. نمودار شماره 3 نشان می‌دهد که تعداد فولیکول‌های بدوی، اولیه و ثانویه آنترزی‌شده ($P \leq 0/001$) و نیز فولیکول‌های آنترال آنترزی‌شده ($P=0/004$) به‌واسطه دریافت سیس پلاتین در گروه کنترل مثبت نسبت به کنترل منفی افزایش یافته است. هم‌چنین تعداد فولیکول‌های بدوی و اولیه آنترزی شده با سطح معنی‌داری $P < 0/001$ و آنترال آنترزی شده با سطح معنی‌داری $P < 0/03$ در تمام گروه‌های تیماری (T1 تا T6) نسبت به گروه کنترل مثبت کاهش یافته است. تعداد فولیکول‌های ثانویه آنترزی شده در گروه‌های T2 تا T6 نسبت به کنترل مثبت کاهش یافته است و سطح معنی‌داری به ترتیب $P=0/028$ ، $P=0/008$ ، $P=0/009$ ، $P < 0/001$ و $P < 0/001$ می‌باشد. اگرچه تجویز ویتامین C در گروه T1 باعث کاهش این پارامتر نسبت به کنترل مثبت شد اما این اختلاف معنی‌دار نبوده است ($P > 0/05$). هم‌چنین تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیمار شده وجود نداشته است ($P > 0/05$).



نمودار شماره 2: تعداد انواع فولیکول های سالم در گروه های مختلف. داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SD) ارائه شده اند. محور x، گروه های مختلف و محور y، تعداد انواع فولیکول های سالم را نشان می دهد. حروف نامشابه در گروه های مختلف نشان دهنده تفاوت آماری معنی دار است ($P < 0/05$) و داده های واجد حداقل یک حرف مشترک نشان دهنده عدم وجود تفاوت آماری معنی دار می باشد ($P > 0/05$)



نمودار شماره 3: تعداد انواع فولیکول های آتروزی شده در گروه های مختلف. داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SD) ارائه شده اند. محور x، گروه های مختلف و محور y، تعداد انواع فولیکول های آتروزی شده را نشان می دهد. حروف نامشابه در گروه های مختلف نشان دهنده تفاوت آماری معنی دار است ($P < 0/05$) و داده های واجد حداقل یک حرف مشترک نشان دهنده عدم وجود تفاوت آماری معنی دار می باشد ($P > 0/05$)

ه) تعداد جسم زرد

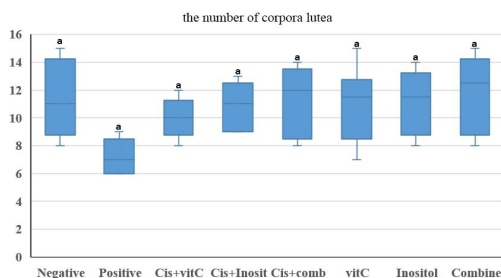
تعداد جسم زرد در گروه‌های مورد آزمایش به قرار زیر می‌باشد.

همان‌گونه که در نمودار شماره 4 نشان داده شده است، تعداد جسم زرد در حیوانات دریافت کننده سیس پلاتین (کنترل مثبت) نسبت به کنترل منفی کاهش یافته است اما این اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد ($P > 0/05$). همچنین اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف با کنترل منفی وجود ندارد ($P > 0/05$).

و) پاتولوژی بافت رحم

همان‌طور که تصویر شماره 2 نشان می‌دهد: A. در گروه کنترل منفی، اپی‌تلیوم استوانه‌ای ساده همراه با لامینا پروپریا سالم و دهانه غدد طبیعی مشاهده می‌شود. B. در گروه کنترل مثبت (سیس پلاتین) در برخی مقاطع، هیپرپلازی اپی‌تلیوم و کاهش تعداد غدد مشاهده می‌گردد. C. در گروه تیمار 1 اپی‌تلیوم در برخی قسمت‌ها ریزش یافته و تعداد غدد کم است. D. در گروه تیمار 2 اپی‌تلیوم از حالت استوانه‌ای به سنگفرشی تغییر یافته و تعداد غدد کم است. E. در گروه تیمار 3 اپی‌تلیوم در برخی قسمت‌ها ریزش یافته اما دهانه غدد قابل مشاهده است. F. در گروه تیمار 4 اپی‌تلیوم استوانه‌ای ساده طبیعی و دهانه غدد قابل مشاهده است. در برخی نواحی

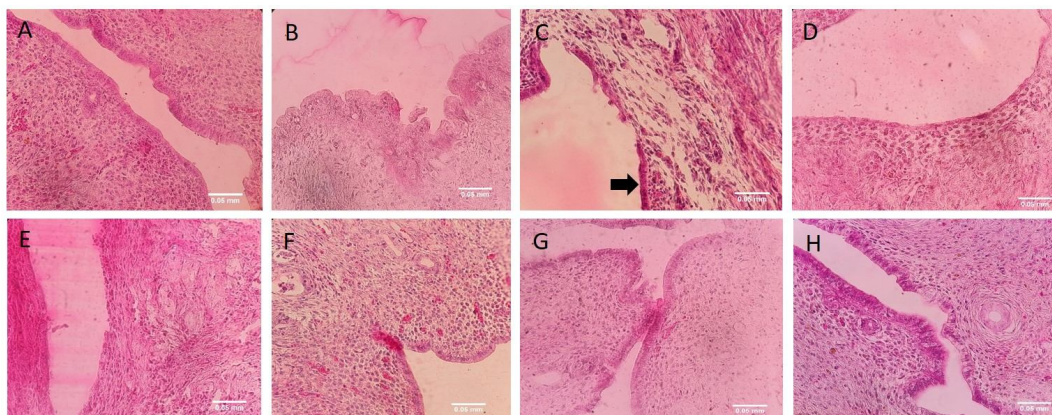
پرخونی مشاهده می‌شود. G. در گروه تیمار 5 بافت سالم و دهانه غدد به فراوانی نیز قابل مشاهده است. H. در گروه تیمار 6 اپی‌تلیوم طبیعی و استوانه‌ای ساده بوده، دهانه غدد قابل مشاهده است.



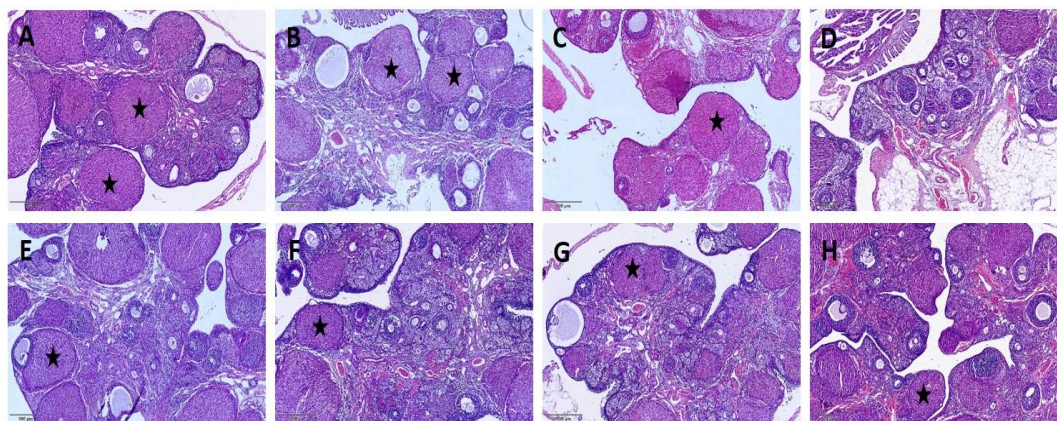
نمودار شماره 4: تعداد جسم زرد در گروه‌های مختلف. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($\text{Mean} \pm \text{SD}$) ارائه شده‌اند. محور x، گروه‌های مختلف و محور y، تعداد جسم زرد را نشان می‌دهد. حروف مشابه در گروه‌های مختلف نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت آماری معنی‌دار است ($P > 0/05$).

بحث

استفاده از داروهای شیمی‌درمانی علی‌رغم اثرات مفید در درمان بیماران سرطانی، عوارض جانبی بسیاری را موجب می‌شود. یکی از رایج‌ترین داروهای مورد استفاده در این زمینه سیس پلاتین است. این دارو برای درمان سرطان‌های مختلفی از جمله سرطان تخمدان،



تصویر شماره 2: مقاطع بافت رحم. پیکان ضخیم: اپیتلیوم رحم، پیکان نازک: غدد رحمی و نوک پیکان نشان‌دهنده پرخونی عروقی می‌باشد. تصاویر A تا H به ترتیب نمایانگر بافت رحم در گروه‌های کنترل منفی، کنترل مثبت و گروه‌های تیمار 1 تا 6 می‌باشد. رنگ آمیزی H & E و بزرگنمایی تصاویر 400X



تصویر شماره 1: نمایی از تخمدان در گروه‌های مختلف. تصاویر A تا H به ترتیب نمایان گر بافت تخمدان در گروه‌های کنترل منفی، کنترل مثبت و گروه‌های تیمار 1 تا 6 می‌باشد. در گروه کنترل مثبت سیس پلاتین تعداد انواع فولیکول‌های سالم را نسبت به گروه کنترل منفی کاهش داده است. درمان با داروهای مورد مطالعه در گروه‌های تیمار 1 تا 6 تعداد فولیکول‌های سالم را نسبت به گروه کنترل مثبت افزایش داده‌است. ستاره: جسم زرد - رنگ آمیزی H & E و بزرگنمایی تصاویر 400X

مشاهده تفاوت معنی‌دار در این امر می‌تواند ناشی از حجم پایین نمونه، کم بودن دوره تیمار و یا کاهش وزن به دلیل استرس ناشی از مداخله از قبیل در دست گرفتن و تجویز داروهای مختلف باشد که در تمام گروه‌ها مشابه بوده است.

بسیاری از مطالعات گزارش کرده‌اند که سیس پلاتین از طریق ایجاد اختلال در سیکل استروس و کاهش تعداد فولیکول‌های تخمدانی باعث ایجاد نارسایی زودرس تخمدان می‌شود (18، 42-45). در همین راستا نتایج هیستوپاتولوژیک پژوهش حاضر نشان داد که تعداد انواع فولیکول‌های تخمدان اعم از فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و آنترال در اثر سیس پلاتین به شدت کاهش یافته و در مقابل فولیکول‌های آنترزی شده به نحو چشمگیری افزایش یافته‌اند. فولیکول‌هایی که بیش از 20 سلول گرانولوزای آپوتوز شده و یا بی نظم داشته باشند، همچنین فولیکول‌های حاوی اووسیت دژنره، تحت عنوان فولیکول آنترزی شده شناخته می‌شوند (41).

همچنین در بررسی هیستوپاتولوژیک تخمدان، تعداد جسم زرد نیز شمارش شد که اگرچه در اثر

گردن رحم، میومتر و ... مورد استفاده قرار می‌گیرد، ولی با تاثیر مستقیم بر ارگان‌های تولیدمثلی و آسیب قابل توجهی که به آن‌ها وارد می‌کند باعث ایجاد ناباروری می‌شود (18، 42). در این مطالعه اثرات اینوزیتول و ویتامین C بر سمیت تخمدان و رحم ناشی از سیس پلاتین در موش‌های صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که سیس پلاتین باعث کاهش وزن حیوانات در پایان دوره درمان (یک هفته پس از دریافت سیس پلاتین)، می‌شود. دلیل این امر احتمالاً ناشی از سمیت ایجاد شده در ارگان‌های مختلف توسط داروی سیس پلاتین است، هرچند کاهش وزن نسبت به گروه کنترل منفی معنی‌دار نبوده است.

در مطالعه حاضر درمان با ویتامین C و اینوزیتول و یا ترکیب توأمان آن‌ها باعث بهبود وزن‌گیری در موش‌های صحرایی شد، ولی اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه‌های مختلف وجود نداشت. همچنین اگرچه تجویز این ترکیبات در طول مدت درمان (21 روز) سبب شد تا حدی اثر کاهش وزن ناشی از سیس پلاتین تعدیل شود، ولی این تفاوت باعث نشد تا وزن این حیوانات به وزن ایده‌آل و سابق خود بازگردد. دلیل عدم

مطلق و نسبی رحم و نیز وزن تخمدان را در مطالعه حاضر نسبت به گروه کنترل منفی کاهش داد. این کاهش وزن می تواند به دلیل اثرات سمی سیس پلاتین بر روی DNA سلولی و به دنبال آن القای آپوپتوز باشد. همچنین ممکن است سیس پلاتین با تشدید استرس اکسیداتیو (تولید گونه های فعال اکسیژن و آسیب به غشای سلولی) منجر به آسیب سلولی و در نهایت کاهش وزن این بافت ها شده باشد. القای آپوپتوز و تشدید استرس اکسیداتیو در بافت های رحم و تخمدان توسط سیس پلاتین در مطالعات قبل به اثبات رسیده است (20، 48-50). تجویز ترکیبات مورد استفاده به حیوانات بیمار (گروه های T1، T2 و T3) در این مطالعه، وزن نسبی و مطلق ارگان ها را به طور معنی داری افزایش نداد که احتمالاً به دلیل طول مدت کوتاه دوره درمان (7 روز پس از تجویز سیس پلاتین) بوده است.

همچنین تجویز اینوزیتول و ویتامین C، در حیوانات سالم (گروه های T4، T5 و T6) تغییر چندانی در این پارامترها نسبت به کنترل منفی ایجاد نکرد. قابل ذکر است که ابعاد تخمدان هیچ گونه تفاوت آماری معنی داری بین گونه های مختلف نداشته است. به نظر می رسد کوچک بودن اندازه تخمدان موش صحرانی در حالت طبیعی و عدم دسترسی به وسایل با دقت بالاتر و نیز مدت کوتاه مداخله در مطالعه حاضر در این مورد نیز بی تاثیر نباشد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه دکتری حرفه ای دامپزشکی با کد اخلاق IR.RAZI.REC.1400.095 می باشد. بدین وسیله از زحمات کلیه همکاران و کارکنان دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی کرمانشاه به ویژه بخش پاتولوژی تشکر و قدردانی می گردد.

تجویز سیس پلاتین کاهش یافت ولی این اختلاف معنی دار نبوده است. در این رابطه لازم به ذکر است که در موش صحرایی، اجسام زرد در سیکل استروسی که تولید شده، بالغ می شوند ولی ممکن است کمی تحلیل رفته و در چندین سیکل استروس بعد حضور داشته باشند (46). بنابراین ممکن است به همین دلیل در مطالعه ما، اختلاف آماری معنی داری بین تعداد اجسام زرد در گروه کنترل مثبت در مقایسه با کنترل منفی وجود نداشته است، اگر چه به واسطه دریافت سیس پلاتین کاهش یافته است. چرا که برخی از اجسام زرد موجود در تخمدان در زمان آسان کشی، ممکن است در سیکل های قبلی استروس حیوانات تولید شده و تا زمان مذکور حفظ شده باشند. درمان با ویتامین C، اینوزیتول و یا ترکیب آن ها توانست به طور موثری تعداد فولیکول های سالم کاهش یافته توسط سیس پلاتین را افزایش داده و فولیکول های آترزی شده را کاهش دهد به نحوی که این پارامترها به اندازه مقادیر طبیعی خود (کنترل منفی) برسند. تجویز داروهای مذکور در حیوانات سالم (T4، T5 و T6) اثرات مثبت اندکی داشته ولی تفاوت معنی داری در پارامترهای گفته شده ایجاد نکرد. با توجه به نتایج هیستوپاتولوژی تخمدان می توان بیان کرد که اینوزیتول و ویتامین C به تنهایی و یا با هم می توانند ذخیره تخمدانی را افزایش داده و آسیب تخمدان ناشی از سیس پلاتین را به نحو موثری بهبود بخشند.

نتایج هیستوپاتولوژی رحم همانند مطالعات گذشته (۴۷، ۲۷)، نشان داد که سیس پلاتین موجب هیپرپلازی اپی تلیوم، پرخونی و کاهش تعداد غدد رحمی شده است و درمان با اینوزیتول و ویتامین C در برابر این تغییرات پاتولوژیک، اثرات محافظتی داشته است. همچنین سیس پلاتین به طور قابل توجهی وزن

References

1. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. Clin Biochem 2018; 62: 2-10.
2. Rutstein SO, Shah IH. Infecundity, infertility, and childlessness in developing countries. Maryland, USA; WHO: 2004.

3. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Mathers CD, Stevens GA. Trends in primary and secondary infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of demographic and reproductive health surveys. *Lancet* 2013; 81(Supp2): S90.
4. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 2007; 22(6): 1506-1512.
5. Woodruff T, Snyder KA. Oncofertility: fertility preservation for cancer survivors. 1st ed. New York: Springer; 2007.
6. Wallace WHB. Oncofertility and preservation of reproductive capacity in children and young adults. *Cancer* 2011; 117(S10): 2301-2310.
7. Jang H, Hong K, Choi Y. Melatonin and fertoprotective adjuvants: prevention against premature ovarian failure during chemotherapy. *Int J Mol Sci* 2017; 18(6): 1221.
8. Gellert SE, Pors SE, Kristensen SG, Bay-Bjørn AM, Ernst E, Yding Andersen C. Transplantation of frozen-thawed ovarian tissue: an update on worldwide activity published in peer-reviewed papers and on the Danish cohort. *J Assist Reprod Genet* 2018; 35(4): 561-570.
9. Partridge AH, Ruddy KJ. Fertility and adjuvant treatment in young women with breast cancer. *Breast* 2007; 16(Supp2): S175-181.
10. Li S, Yuan S, Zhao Q, Wang B, Wang X, Li K. Quercetin enhances chemotherapeutic effect of doxorubicin against human breast cancer cells while reducing toxic side effects of it. *Biomed Pharmacother* 2018; 100: 441-447.
11. Senger PL. Pathways to pregnancy and parturition. 2nd ed. Pullman: Current Conceptions, Inc; 2004.
12. Richards JS, Ren YA, Candelaria N, Adams JE, Rajkovic A. Ovarian follicular theca cell recruitment, differentiation, and impact on fertility: 2017 update. *Endocr Rev* 2018; 39(1): 1-20.
13. Aldossary SA. Review on pharmacology of cisplatin: clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. *Biomed Pharmacol J* 2019; 12(1): 7-15.
14. Miyoshi T, Uoi M, Omura F, Tsumagari K, Maesaki S, Yokota C. Risk factors for cisplatin-induced nephrotoxicity: a multicenter retrospective study. *Oncology* 2021; 99(2): 105-113.
15. Lins TL, Gouveia BB, Barberino RS, Silva RL, Monte AP, Pinto JG, et al. Rutin prevents cisplatin-induced ovarian damage via antioxidant activity and regulation of PTEN and FOXO3a phosphorylation in mouse model. *Reprod Toxicol* 2020; 98: 209-217.
16. Sarin N, Engel F, Rothweiler F, Cinatl Jr J, Michaelis M, Frötschl R, et al. Key players of cisplatin resistance: towards a systems pharmacology approach. *Int J Mol Sci* 2018; 19(3): 767.
17. Brown A, Kumar S, Tchounwou PB. Cisplatin-based chemotherapy of human cancers. *J Cancer Sci Ther* 2019; 11(4): 97.
18. Morgan S, Lopes F, Gourley C, Anderson RA, Spears N. Cisplatin and doxorubicin induce distinct mechanisms of ovarian follicle loss; imatinib provides selective protection only against cisplatin. *PloS One* 2013; 8(7): e70117.
19. Goldman KN, Chenette D, Arju R, Duncan FE, Keefe DL, Grifo JA, et al. mTORC1/2 inhibition preserves ovarian function and fertility during genotoxic chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci US A* 2017; 114(12): 3186-3191.
20. Kaygusuzoglu E, Caglayan C, Kandemir FM, Yıldırım S, Kucukler S, Kılınç MA, et

- al. Zingerone ameliorates cisplatin-induced ovarian and uterine toxicity via suppression of sex hormone imbalances, oxidative stress, inflammation and apoptosis in female wistar rats. *Biomed Pharmacother* 2018; 102: 517-530.
21. Nguyen QN, Zerafa N, Liew SH, Findlay JK, Hickey M, Hutt KJ. Cisplatin-and cyclophosphamide-induced primordial follicle depletion is caused by direct damage to oocytes. *Mol Hum Reprod* 2019; 25(8): 433-444.
 22. Vijayalakshmi B, Sesikeran B, Udaykumar P, Kalyanasundaram S, Raghunath M. Chronic low vitamin intake potentiates cisplatin-induced intestinal epithelial cell apoptosis in WNIN rats, *World J Gastroenterol* 2006; 12(7): 1078-1085.
 23. Khan R, Khan AQ, Qamar W, Lateef A, Tahir M, Rehman MU, et al. Chrysin protects against cisplatin-induced colon. toxicity via amelioration of oxidative stress and apoptosis: probable role of p38MAPK and p53. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 258(3): 315-329.
 24. Flohé L. Looking back at the early stages of redox biology. *Antioxidants* 2020; 9(12): 1254.
 25. Collin F. Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci* 2019; 20(10): 2407.
 26. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21(7): 363-383.
 27. Pandir D, Kara O, Kara M. Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) on cisplatin induced ovarian damage in rat. *Cytotechnology* 2014; 66(4): 677-685.
 28. Abdollahifar MA, Azad N, Sajadi E, Mofarahe ZS, Zare F, Moradi A, et al. Vitamin C restores ovarian follicular reservation in a mouse model of aging. *Anat Cell Biol* 2019; 52(2): 196-203.
 29. Olaniyan OT, Femi A, Iliya G, Ayobami D, Godam E, Olugbenga E, et al. Vitamin C suppresses ovarian pathophysiology in experimental polycystic ovarian syndrome. *Pathophysiology* 2019; 26(3-4): 331-341.
 30. Shekelle P, Hardy ML, Coulter I, Udani J, Spar M, Oda K, et al. Effect of the Supplemental Use of Antioxidants Vitamin C, Vitamin E, and Coenzyme Q10 for the Prevention and Treatment of Cancer .*Evid Rep Technol Assess (Summ)* 2003; (75): 1-3.
 31. Zhou C, Zhang X, Zhang Y, ShiYang X, Li Y, Shi X, et al. Vitamin C protects carboplatin-exposed oocytes from meiotic failure. *Mol Hum Reprod* 2019; 25(10): 601-613.
 32. Azouz AA, Ali SE, Abd-Elsalam RM, Emam SR, Galal MK, Elmosalamy SH, et al. Modulation of steroidogenesis by *Actaea racemosa* and vitamin C combination, in letrozole induced polycystic ovarian syndrome rat model: promising activity without the risk of hepatic adverse effect. *Chin Med* 2021; 16(1): 36.
 33. Muscogiuri G, Palomba S, Laganà AS, Orio, F. Current insights into inositol isoforms, Mediterranean and ketogenic diets for polycystic ovary syndrome: from bench to bedside. *Curr Pharm Des* 2016; 22(36): 5554-5557.
 34. Paul C, Lagana AS, Maniglio P, Triolo O, Brady DM. Inositol's and other nutraceuticals' synergistic actions counteract insulin resistance in polycystic ovarian syndrome and metabolic syndrome: state-of-the-art and future perspectives. *Gynecol Endocrinol* 2016; 32(6): 431-438.
 35. Russo M, Forte G, Montanino Oliva M, Laganà

- AS, Unfer V. Melatonin and myo-inositol: Supporting reproduction from the oocyte to birth. *Inte J Mol Sci* 2021; 22(16): 8433.
36. Fruzzetti F, Perini D, Russo M, Bucci F, Gadducci A. Comparison of two insulin sensitizers, metformin and myo-inositol, in women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Gynecol Endocrinol* 2017; 33(1): 39-42.
 37. Cooper R. Monitoring of estrous cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. *Female Reproductive Toxicology* 1993; 45-56.
 38. Dayangan Sayan C, Tulmac OB, Karaca G, Ozkan ZS, Yalcin S, Devrim T, et al. Could erythropoietin reduce the ovarian damage of cisplatin in female rats? *Gynecol Endocrinol* 2018; 34(4): 309-313.
 39. Nishi K, Gunasekaran VP, Arunachalam J, Ganeshan M. Doxorubicin-induced female reproductive toxicity: an assessment of ovarian follicular apoptosis, cyclicity and reproductive tissue histology in Wistar rats. *Drug Chem Toxicol* 2018; 41(1): 72-81.
 40. Osman P. Rate and course of atresia during follicular development in the adult cyclic rat. *J Reprod Fertil* 1985; 73(1): 261-270.
 41. Samare-Najaf M, Zal F, Safari S, Koohpeyma F, Jamali N. Stereological and histopathological evaluation of doxorubicin-induced toxicity in female rats' ovary and uterus and palliative effects of quercetin and vitamin E. *Hum Exp Toxicol* 2020; 39(12): 1710-1724.
 42. Atli M, Engin-Ustun Y, Tokmak A, Caydere M, Hucumenoglu S, Topcuoglu C. Dose dependent effect of resveratrol in preventing cisplatin-induced ovarian damage in rats: an experimental study. *Reprod Biol* 2017; 17(3): 274-280.
 43. Borovskaya TG, Goldberg VE, Fomina TI, Pakhomova AV, Kseneva SI, Poluektova ME, et al. Morphological and functional state of rat ovaries in early and late periods after administration of platinum cytostatics. *Bull Exp Biol Med* 2004; 137(4): 331-335.
 44. Molina JR, Barton DL, Loprinzi CL. Chemotherapy-induced ovarian failure. *Drug Saf* 2005; 28(5): 401-416.
 45. Blumenfeld Z. Chemotherapy and fertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2012; 26(3): 379-390.
 46. OECD (n d). Part 3: Female Reproductive System. Available at: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/43754782.pdf>. Accessed June 3, 2023.
 47. Saribas GS, Erdogan D, Goktas G, Akyol SN, Hirfanoglu IM, Gurgun SG, et al. Examining the protective effects of acetyl L-carnitine on cisplatin-induced uterine tube toxicity. *J Obstet Gynaecol* 2016; 36(8): 1086-1092.
 48. Algandaby MM. Quercetin attenuates cisplatin-induced ovarian toxicity in rats: Emphasis on anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activities. *Arab J Chem* 2021; 14(7): 103191.
 49. Ibrahim MA, Albahlol IA, Wani FA, Tammam AA, Kelleni MT, Sayeed MU, et al. Resveratrol protects against cisplatin-induced ovarian and uterine toxicity in female rats by attenuating oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Chem Biol Interact* 2021; 338: 109402.
 50. Al-Shahat A, Hulail MA, Soliman NM, Khamis T, Fericean LM, Arisha AH, et al. Melatonin mitigates cisplatin-induced ovarian dysfunction via altering steroidogenesis, inflammation, apoptosis, oxidative stress, and PTEN/PI3K/Akt/mTOR/AMPK signaling pathway in female rats. *Pharmaceutics* 2022; 14(12): 2769.