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 دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۴/۳۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۹/۰۲

## 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 تقسیم‌شده و به مدت ۲۱ روز تیمار شدند. گروه کنترل حلال بوسولفان را به‌صورت داخل صفاقی تک دز به حجم ۰/۱ ml دریافت کردند. گروه کنترل شم فقط بوسولفان با دز ۱۰mg/kg, IP تک دز دریافت کردند. گروه‌های تجربی شماره ۱، ۲، ۳ به همراه با بوسولفان کروسین با دزهای ۱۰۰mg/kg/day, IP، ۲۰۰، ۴۰۰ دریافت نمودند. گروه کنترل مثبت فقط کروسین با دز ۴۰۰mg/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 موردبررسی قرار گرفت. داده‌های حاصل با استفاده از روش آماری ANOVA یک‌طرفه و تست تعقیبی Bonferroni اختلاف بین تمامی گروه‌ها مورد مقایسه قرار گرفت. اختلاف در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار توصیف گردید.

**نتایج:** نتایج نشان داد که تجویز کروسین همراه با بوسولفان باعث افزایش معنی‌داری در کیفیت اووسیت، میزان لقاح، روند رشد جنینی پیش از لانه گزینی و کیفیت جنین در مقایسه با گروه بوسولفان شد (P<۰/۰۵). علاوه بر این در گروه دریافت‌کننده کروسین آثار مسمومیت مشاهده نگردید.

**نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر نشان داد که کروسین می‌تواند از توان باروری جنس ماده در برابر آسیب‌های ناشی از بوسولفان محافظت کند.

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

## مقدمه

مواد آلکیله کننده ازجمله بوسولفان، جزء داروهای کشنده سلول بوده و وقتی هیدرولیز می‌شود گروه‌های متان سولفونات آزاد می‌کند و این متان سولفونات نهایتاً به اسید متان سولفونیک و تتراهیدروفوران تبدیل می‌شود که باعث آلکیله شدن DNA شده و از همانندسازی DNA و از ترجمه RNA ممانعت می‌کند و آلکیله شدن نیز باعث اتصال متقاطع در DNA گردیده و نهایتاً از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری کرده و همچنین باعث مرگ برنامه‌دار سلول‌ها از طریق مسیر بیان پروتئین P53 می‌گردد (۱). همچنین تزریق بوسولفان در روز ۱۲ حاملگی موش‌ها باعث کاهش قابل‌توجهی در تعداد فولیکول‌ها، اووسیت‌ها و تأخیر در بلوغ فولیکول‌های حفره‌دار موش‌های نوزاد می‌گردد و در ضمن باعث کم شدن حجم و اندازه تخمدان نیز می‌گردد (۲). تحقیقات نشان داده است که بوسولفان از طریق القای استرس اکسیداتیو باعث فعال شدن مسیر مرگ برنامه‌دار در سلول‌های تخمدانی شده و نیز باعث مرگ سایر سلول‌ها می‌گردد (۳). استرس اکسیداتیو درنتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در مقابل ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول ایجاد می‌شود که منجر به تولید انواع رادیکال‌های آزاد شامل آنیون سوپراکسید ($O_2$)، رادیکال هیدروکسیل (OH) و مشتقات غیر رادیکالی اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن ($H_2O_2$) می‌شود. این رادیکال‌های آزاد به‌شدت ناپایدار بوده و به‌طور سریع و غیراختصاصی با مولکول‌های زیستی واکنش نشان داده و منجر به ایجاد و گسترش انواع آسیب‌های سلولی ازجمله

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

پراکسیداسیون غشاء پلاسمایی، اکسیداسیون اسیدهای آمینه و نوکلوئیک، مرگ برنامه‌دار یا آپوپتوز و نکروز می‌شود که درنهایت منجر به کاهش قدرت زیست پذیری و تکوین جنین‌ها در محیط کشت می‌گردد (۴-۵). بوسولفان به‌عنوان دارویی مهم و مؤثر در درمان سرطان، علی‌رغم ایجاد بهبودی در بیماران سرطانی، در بدن به‌عنوان یک عامل تولیدکننده استرس اکسیداتیو عمل کرده و سطح تولید ROS را افزایش می‌دهد. لذا جهت تعدیل و جلوگیری از اثرات استرس اکسیداتیو ایجادشده به‌وسیله بوسولفان عاملی نظیر کروسین که دارای نقش آنتی‌اکسیدانی است، می‌تواند مفید واقع شود.

کارتنوئیدها از طریق عملکرد به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت سلول‌ها و بافت‌ها را از آسیب رادیکال‌های آزاد محافظت نموده و دارای نقش مؤثری در سلامت انسان می‌باشند (۶). گیاهی به نام Crocus sativus L که عموماً سافرون نامیده می‌شود، گیاه بدون پایه از خانواده Iridaceae است. ترکیبات اصلی سافرون؛ کروسین، سافرانال و پیکروکروسین می‌باشند. کروسین استر گلیکوزیله شده کروستین بوده که به‌طور غیرمعمول از کاروتینوئیدهای محلول در آب بوده و علت اصلی رنگ آن است (۶). مطالعات فراوان نشان داده‌اند که کروسین دارای اثرات فارماکولوژیکی مانند محافظت در برابر بیماری‌های قلبی عروقی (۷، ۸ و ۹)، ممانعت از تکثیر سلول‌های توموری (۱۰)، محافظت سلول‌های عصبی (۱۱ و ۱۲) و محافظت از سلول‌های کبدی (۱۳) است. همچنین گزارش‌شده است که کروسین از پراکسیداسیون چربی در کلیه (۱۴) و آسیب عضلات اسکلتی در استرس ایسکمی-رپرفیوژن در موش صحرایی جلوگیری می‌نماید (۱۵). در چند مدل مطالعه داخل آزمایشگاهی نشان داده شده است که کروسین دارای عمل از بردن رادیکال‌های آزاد است (۱۶ و ۱۷).

هنگامی‌که کروسین در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد به نظر می‌رسد که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی است. این فعالیت به نیمه متصل به قند آن ارتباط پیدا می‌کند (۱۸). در یک مطالعه تجویز کروسین به‌صورت داخل صفاقی در موش‌های صحرایی دیابتی باعث شد که در کبد و کلیه سطح اسید تیوباربیتوریک Thiobarbituric acid reactive substance (TBRS) افزایش و تیول تام کاهش‌یافته و موجب پایین آمدن معنی‌دار سطح قند خون گردید. اثرات آنتی‌اکسیدانی کروسین موجب کاهش پراکسیداسیون چربی در کبد و کلیه گردید (۱۹). در یک مطالعه دیگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کروسین با روش‌های 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 آنتی‌اکسیدانی آهن Ferric reducing antioxidant power (FRAP) متعاقب استرس ایسکمی-رپرفیوژن کلیه گردید (۲۰).

ازآنجایی‌که تابه‌حال مطالعه‌ای درزمینه‌ی تأثیر کروسین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز بوسولفان بر روی رشد جنین‌های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی صورت نگرفته است، در این مطالعه، اثر محافظتی کروسین بر بهبود روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی در موش‌های تحت درمان با بوسولفان موردمطالعه قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، ۱۸ موش سفید کوچک آزمایشگاهی (سوری) ماده نژاد NMRI با وزن تقریبی ۲۵ گرم به‌طور تصادفی به ۶ گروه مساوی تقسیم‌شده و به مدت ۲۱ روز تیمار شدند. حیوانات در شرایط استاندارد با دمای ۲+۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۶۰-۳۰ درصد و با سیکل نوری، ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند. آب و غذا به‌صورت 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 میلی‌لیتر به‌صورت داخل صفاقی) دریافت نمودند، گروه کنترل شم BSF با دز ۱۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت تک دز به‌طور داخل صفاقی دریافت نمودند، گروه‌های تجربی بوسولفان به روش گروه کنترل شم دریافت نمودند و همراه با آن در گروه‌های تجربی شماره ۱، ۲ و ۳ کروسین با حجم ۰/۳ میلی‌لیتر به‌طور روزانه به‌صورت داخل صفاقی به ترتیب با دزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند. گروه کنترل مثبت، فقط کروسین با دز ۴۰۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. برای انجام این مطالعه به تحریک تخمک‌گذاری نیاز بود که بدین منظور پس از پایان دوره درمان و ۷۲ ساعت قبل از لقاح آزمایشگاهی (IVF) تزریق ۷/۵ واحد

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.

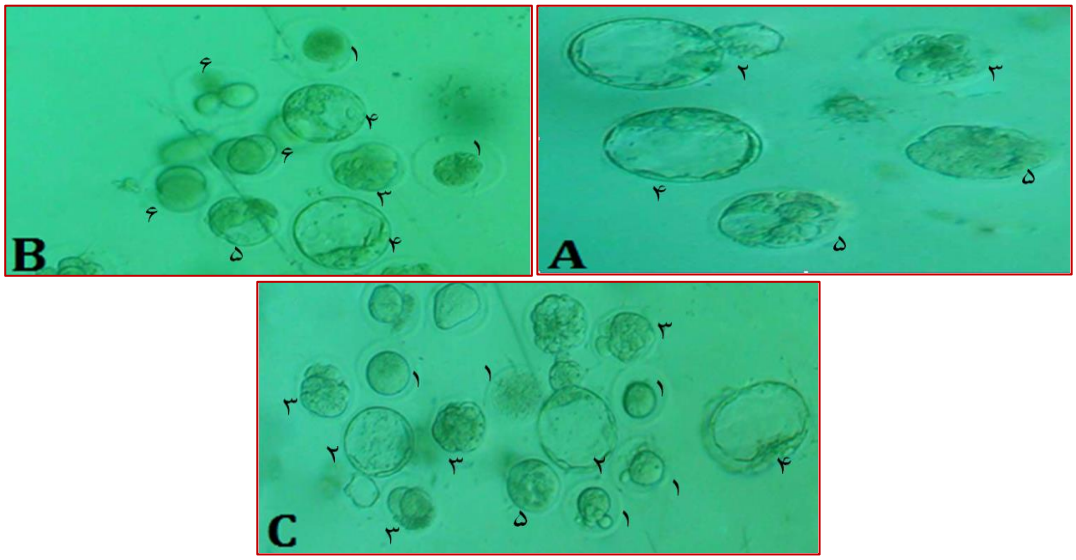
مرحله اول کار برای انجام عمل IVF، تهیه اسپرم‌های نرمال از ۶ قطعه موش سفید کوچک آزمایشگاهی نر بالغ بود که به روش بی‌هوشی با تزریق کتامین (ساخت شرکت Rotexmedica، آلمان) ۲۵mg/kg داخل صفاقی و با تزریق دز بالای دارو آسان کشی شدند. سپس پوست ناحیه شکمی با اتانول ۷۰ درصد استریل شده و پس از ایجاد برش در ناحیه 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، تخمک گیری از موش‌های ماده بود که بدین منظور، ۱۳ ساعت پس از تزریق HCG (صبح روز بعد) با آسان کشی حیوانات بعد از بی‌هوشی با تزریق کتامین (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، درون صفاقی) با تزریق دز بالای دارو آسان کشی شده، سپس لوله‌های رحمی جدا شد و در داخل محیط کشت HTF+ 4mg/L BSA با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد که از قبل آماده شده بود قرار داده شد و با استفاده از روش کالبدشکافی تخمک‌ها خارج‌شده 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 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 ازنظر 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<۰/۰۵ 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<۰/۰۵) و در گروه بوسولفان به‌طور معنی‌دار نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داد (P<۰/۰۵)، 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<۰/۰۵)، درحالی‌که تجویز بوسولفان به همراه کروسین وابسته به دز کروسین بوده و تعداد زایگوت‌های لقاح یافته را نسبت به گروه




**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 ازنظر 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 ازنظر مورفولوژی دارند و درصد کمی از جنین‌ها متوقف شده‌اند. (میکروسکوپ اینورت، بزرگنمایی ×۴۰۰)

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

بوسولفان افزایش داد (P<۰/۰۵).

همچنین نشان داده شد که فرایند شکافتگی در میانگین تعداد زایگوت‌های دوسلولی در گروه بوسولفان نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌دار کاهش نشان داد (P<۰/۰۵)، 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<۰/۰۵).

ارزیابی میانگین تعداد بلاستوسیست‌های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی نشان داد که تعداد بلاستوسیست‌ها در گروه بوسولفان به‌طور معنی‌دار نسبت به گروه کنترل کاهش یافت (P<۰/۰۵)، ولی در گروه‌های دریافت‌کننده بوسولفان به همراه کروسین نسبت به گروه بوسولفان به‌طور وابسته به دز کروسین افزایش نشان داد (P<۰/۰۵).

همچنین ارزیابی میانگین تعداد زایگوت‌های هچ شده نشان داد که در گروه بوسولفان تعداد زایگوت‌های هچ شده نسبت به گروه کنترل کاهش‌یافته 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<۰/۰۵).

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 موردمطالعه در رابطه با تمامی پارامترهای لقاح داخل آزمایشگاهی به‌استثناء تعداد زیگوت‌های هچ شده دارای اخلاف 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 متوقف‌شده در مراحل مختلف و مقایسه آن‌ها در بین گروه‌های موردمطالعه (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 ± ۱/۵۲bc | 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 |
|---|---|---|---|---|
| اوسیت | ۵ | ۳۸/۹۳۳ | ۷/۶۱۷ | /۰۲ |
| | ۱۲ | ۵/۱۱۱ | | |
| | ۱۷ | | | |
| زیگوت | ۵ | ۵۱۲/۵۳۳ | ۱۳/۰۴۹ | /۰۰۰ |
| | ۱۲ | ۳۹/۲۷۸ | | |
| | ۱۷ | | | |
| سلول | ۵ | ۳۵۵/۶۵۶ | ۱۶/۸۴۷ | /۰۰۰ |
| | ۱۲ | ۲۱/۱۱۱ | | |
| | ۱۷ | | | |
| یلاستوسیت | ۵ | ۵۷۱/۸۳۳ | ۲۹/۶۶۳ | /۰۰۰ |
| | ۱۲ | ۱۹/۲۷۸ | | |
| | ۱۷ | | | |
| هچ | ۵ | ۲۸۴/۳۲۲ | /۵۵۳ | /۷۳۴ |
| | ۱۲ | ۵۱۴/۰۵۶ | | |
| | ۱۷ | | | |
| اررست | ۵ | ۵۵۹/۱۲۲ | ۲۴/۲۵۱ | /۰۰۰ |
| | ۱۲ | ۲۳/۰۵۶ | | |
| | ۱۷ | | | |

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

آزمایشگاهی می‌گردد. در یک مطالعه تجویز یک دز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان در موش به‌طور قابل‌توجهی تعداد فولیکول‌های آترتیک را افزایش داد که نشان‌دهنده عوارض جانبی بوسولفان در سلول‌های تکثیر شونده است. بوسولفان بر روی سلول‌ها با توانایی تقسیم بیشتر از طریق آلکیلاسیون 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 فرزندانی 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 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 لوله‌ای، تجمعی و اسپرمیوژنز، ضخامت کپسول بیضه، تعداد سلول‌های سرتولی فعال و همچنین مقادیر سوپراکسید دیسموتاز و تستوسترون نسبت به گروه دریافت‌کننده Cp به‌تنهایی طور معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) افزایش یابد (۳۱). بوسولفان، آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز GSH (Glutathione S-Transferase) 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 Follicul 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

را در گروه‌های دریافت‌کننده کروسین با دزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم 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 تولیدشده توسط بوسولفان شده (۱۸) و از این طریق باعث کاهش میانگین تعداد جنین‌های متوقف‌شده در گروه‌های دریافت‌کننده کروسین با دزهای مختلف گردید. درمجموع 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 به‌دست‌آمده، مطالعه حاضر این ایده را تقویت می‌کند که سمیت تولیدمثلی ناشی از تجویز بوسولفان به‌واسطه استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد و یک آنتی‌اکسیدانت قوی مانند کروسین می‌تواند سیستیم تولیدمثلی را از آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو ایجادشده به‌وسیله بوسولفان که اغلب موجب ناباروری می‌شود محافظت نماید. به نظر می‌رسد که اثر کروسین وابسته به دز تجویزشده بوده و در ۴۰۰ میلی‌گرم 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 استخراج‌شده 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 منافعی را اعلام نکرده اند.

## 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, Manez 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. Irn. 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 Pharmaco*l. 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, Soltanalinejad 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 busolfan 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