

مطالعه اثر محافظتی کروسین بر ماست سل‌ها و عروق خونی و تغییرات بیوشیمیایی تخمدان و سرم موش‌های سوری متعاقب استرس اکسیداتیو ناشی از بوسولفان

حمیدرضا حسن‌زاده خانمیری، Ph.D. رسول شهروز،* Ph.D.، شاپور حسن‌زاده، Ph.D.، غلامرضا نجفی، Ph.D.

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

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: r.shahrooz@urmia.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۲۱

چکیده

هدف: هدف این مطالعه ارزیابی اثرات محافظتی کروسین بر ماست سل‌ها و عروق خونی و تغییرات بیوشیمیایی تخمدان و سرم در موش‌های درمان شده با بوسولفان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۳۰ سر موش نژاد NMRI در ۶ گروه مساوی در یک دوره ۲۱ روزه مورد مطالعه قرار گرفتند. گروه کنترل سالم، حلال بوسولفان به حجم ۰/۱ میلی لیتر و گروه بوسولفان، فقط بوسولفان با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم تک دوز دریافت کردند. گروه‌های تجربی شماره ۱، ۲، ۳ کروسین را به ترتیب با دوزهای ۱۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه به همراه بوسولفان با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم تک دوز دریافت نمودند. گروه کنترل مثبت، کروسین با دوز ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه دریافت نمود. پایان دوره تخمدان چپ موش‌ها جهت مطالعه ماست سل‌ها و عروق خونی و تخمدان راست و سرم خونشان جهت ارزیابی‌های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند. داده‌های حاصله با استفاده از نرم افزار SPSS و روش آماری ANOVA یک طرفه و تست تعقیبی Tukey مورد مقایسه قرار گرفتند و اختلاف در سطح $p < 0/5$ معنی‌دار توصیف شد.

نتایج: نتایج نشان داد بوسولفان باعث افزایش معنی‌دار ماست سل‌ها ($p = 0/011$) و کاهش معنی‌دار عروق خونی ($p = 0/009$) و افزایش معنی‌دار مالون دی‌آلدئید ($p = 0/000$) و کاهش معنی‌دار آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ($p = 0/000$) نسبت به گروه کنترل شد، در حالی که کروسین در تمامی دوزهای مورد استفاده در مطالعه حاضر به خصوص در دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به طور قابل توجهی آثار نامطلوب بوسولفان را تعدیل نمود.

نتیجه‌گیری: متعاقب این تحقیق مشخص شد که کروسین به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانسی می‌تواند به طور قابل توجهی عوارض سوء بوسولفان را کاهش دهد.

واژگان کلیدی: کروسین، بوسولفان، تخمدان، استرس اکسیداتیو، موش سوری

مقدمه

سرطان به عنوان یکی از علل اصلی مرگ و میر در جهان به شمار می رود. شیمی درمانی روش متداول درمان سرطان می باشد. بوسولفان از جمله داروهای شیمی درمانی بوده که به طور گسترده مورد استفاده قرار می گیرد. این دارو دارای اثرات جانبی متعددی از جمله سمیت های تولید مثلی می باشد (۱).

بوسولفان عموماً جهت درمان لوسمی مزمن، سرطان تخمدان و همچنین قبل از عمل پیوند مغز استخوان در بیماران سرطانی مورد استفاده قرار می گیرد. آسیب داروهای شیمی درمانی از جمله بوسولفان به DNA سلول منجر به القای پیری و در شرایطی آپوپتوزیس می شود. این دارو توانایی القای آپوپتوزیس را در سلول های زیبا دارد. بوسولفان از گروه داروهای آلکیل کننده بوده و یک دی متان سولفونات می باشد (۲). همچنین بوسولفان از داروهای سیتوتوکسیک نیز بوده و وقتی هیدرولیز می شود گروه های متان سولفونات آزاد کرده و این متان سولفونات نهایتاً به اسید متان سولفونیک و تتراهیدروفوران تبدیل شده که باعث آلکیل شدن DNA شده و از همانند سازی DNA و ترجمه RNA ممانعت می کند (۳). آلکیل شدن باعث Cross Linking در DNA نیز شده و در نهایت از تکثیر سلول های سرطانی جلوگیری کرده و باعث آپوپتوزیس سلول ها از طریق مسیر P53 می گردد (۴).

عدم تعادل بین آنتی اکسیدانت ها و اکسیدانت ها باعث ایجاد استرس اکسیداتیو می شود (۵، ۶) که برای کاهش اثرات استرس اکسیداتیو بایستی از آنتی اکسیدانت ها استفاده کرد (۷). در سال های اخیر تحقیقات نشان داده که نمونه های گیاهی می توانند به عنوان داروهای موثری به عنوان آنتی اکسیدانت مناسب مورد استفاده قرار بگیرند (۸، ۹).

کلاله گل زعفران (*Crocus sativus*) شامل مواد شیمیایی متنوعی می باشد (۱۰). کروسین موجود در زعفران به عنوان کاروتنوئید گلیکوزیده با تاثیر متنوع فارماکولوژیکی می باشد (۱۱) که از جمله این تاثیرات می توان حفاظت سلول های عضله قلبی در آسیب های هیپوکسی (۱۲) و خاصیت حفاظتی آنتی اکسیدانتی روی سلول های سرطانی (۱۳، ۱۴) و خاصیت ضدافسردگی (۱۵، ۱۶) و خاصیت ضدالتهابی (۱۷) را نام برد. مطالعات نشان داده کروسین دارای ترکیبات کاروتنوئید، مونوترپن آلدئید، پیکروکروسین و سافرانال می باشد (۱۸).

مطالعه حاضر با هدف تعیین اثرات سوء بوسولفان در تخمدان و سرم و اثر محافظتی کروسین متعاقب تنش اکسیداتیو ناشی از مصرف بوسولفان در موش های سفید کوچک آزمایشگاهی تحت درمان با دوزهای متفاوت کروسین انجام گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه ۳۰ سر موش سوری نژاد NMRI بالغ سالم با وزن ۲۵-۲۲ گرم از شرکت مد زیست سامانه پیشرو تهران تهیه شد و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی گراد و رطوبت ۶۰-۳۰ درصد در حیوان خانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه نگهداری شدند. موش ها محدودیتی از نظر دسترسی به آب و غذا نداشتند. مطالعه حاضر براساس دستورالعمل کار با حیوانات آزمایشگاهی کمیته اخلاقی دانشگاه ارومیه انجام شد (کد اخلاقی: AECVU-197-2019). تمامی آزمایشات این تحقیق در آزمایشگاه بافت شناسی و جنین شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انجام گرفت.

موش ها به طور تصادفی به ۶ گروه ۵ تایی تقسیم شدند:

گروه کنترل سالم، حلال BSF (بوسولفان) را به مقدار ۵۰ درصد DMSO و ۵۰ درصد PBS با حجم ۰/۱ میلی لیتر به صورت داخل صفاقی (IP) تک دوز و گروه بوسولفان، فقط بوسولفان با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم داخل صفاقی، تک دوز به حجم ۰/۱ میلی لیتر دریافت کردند (۱۹).

گروه‌های تجربی شماره ۱، ۲، ۳، کروسین را به ترتیب با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه داخل صفاقی به حجم ۰/۳ میلی‌لیتر به همراه بوسولفان با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داخل صفاقی تک دوز به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر دریافت نمودند. گروه کنترل مثبت فقط کروسین با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه داخل صفاقی به حجم ۰/۳ میلی‌لیتر دریافت نمود.

بعد از ۲۱ روز تیمار پیوسته، موش‌ها به وسیله کتامین ۱۰ درصد (محصول انستیتو پاستور ایران) به میزان ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۲ درصد (محصول انستیتو پاستور ایران) به میزان ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم بی‌هوش شده و نمونه‌های خون توسط سرنگ‌های استریل مستقیماً از قلب (بطن راست) با این روش که سرسوزن شماره ۴۲ در طرف چپ قفسه سینه از بین دنده‌های پنج و شش عبور داده شده و به طرف قلب جلو رانده می‌شود و به این ترتیب خون موش‌ها جمع‌آوری شده و در داخل لوله‌های آزمایش قرار گرفتند. سرم‌ها از نمونه‌های خون گرفته شده پس از سانتریفوژ با ۳۰۰۰ mpr به مدت ۱۵ دقیقه، جدا شدند و سپس داخل میکروتیوب استریل ریخته شده و تا زمان آزمایشات بیوشیمیایی در دمای ۰۷- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در مرحله بعدی موش‌ها با دوز بالای داروی بی‌هوشی کتامین ۱۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آسان‌کشی شدند. سپس تخمدان چپ موش‌ها خارج شده و جهت مطالعات ماست سل‌ها و عروق خونی در محلول ثبوتی (فرمالین بافری ۱۰ درصد) قرار داده شدند و پس از اطمینان از ثبوت بافتی، با پارافین قالب‌گیری شده و سپس توسط میکروتوم از بافت‌های تخمدانی مقاطع سریالی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد. نیمی از مقاطع بافتی جهت رنگ آمیزی تولوئیدین بلو برای شمارش ماست سل‌ها و نیمی دیگر از مقاطع بافتی هم جهت رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین برای شمارش عروق خونی اختصاص یافتند. بعد از رنگ آمیزی‌های اختصاصی، شمارش ماست سل‌ها در تمامی قسمت‌های مقاطع بافتی هر تخمدان به دقت انجام گرفته و ثبت شدند. همین‌طور تمامی مقاطع عروقی در همه قسمت‌های مقاطع بافتی تخمدان‌ها هم به دقت شمارش شده و ثبت شدند (۲۰).

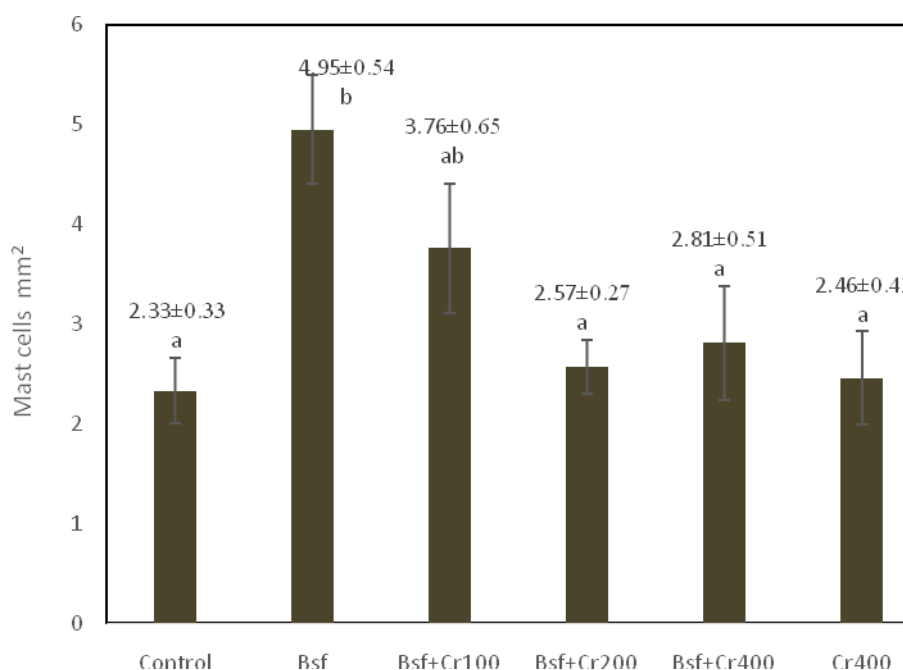
تخمدان راست موش‌ها نیز جهت ارزیابی مالون‌دی‌آلدئید (Malondialdehyde) خارج شده و به همراه سرم‌ها در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا روز انجام آزمایشات قرار گرفتند. MDA شاخص پراکسیداسیون لیپیدی بوده و جهت تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدی، مقدار تولید MDA در بافت تخمدان با استفاده از روش واکنش تیوباربیتوریک اسید (Thiobarbituric acid) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت که به منظور انجام این آزمایش ۱cc از بافت هموزن شده (۱۰ درصد وزن حجمی از بافت‌های تخمدان فریز شده با KCl ۱۰ درصد هموزن شدند) با ۲cc از محلول MDA مخلوط شدند و به مدت ۱۵ دقیقه درون boiler در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و در نهایت پس از سرد کردن میکروتیوب‌ها روی یخ، میزان جذب مایع رویی در طول موج ۵۵۰ نانومتر به وسیله دستگاه الیزا (Biottech-ELX-808iu) محاسبه شد که پس از محاسبه میزان پروتئین در بافت به روش Bradford protein Assay مقدار مالون‌دی‌آلدئید بر حسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد (۲۱).

در نمونه‌های سرم به منظور ارزیابی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase) از کیت Zell Bio GmbH (محصول شرکت Zell Bio کشور آلمان، Cat n: Z185-S, GmbH) بنابر راهنمای شرکت سازنده کیت استفاده شد. در این کیت از واکنش تبدیل آنیون سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و اکسیژن استفاده می‌شود. اندازه‌گیری SOD در کیت مذکور بر اساس تولید رادیکال‌های سوپراکسید تولید شده در سامانه گزانتین و گزانتین اکسیداز انجام می‌شود که با نیترو بلوتترازولیم (Nitro Blue Tetrazolium) واکنش نشان داده و رنگ فورمازان (ارغوانی رنگ) ایجاد می‌کند. در این روش رادیکال‌های سوپراکسید باعث تبدیل NBT به NBTH2 ارغوانی رنگ می‌شوند. با افزودن سرم به محیط آزمایش، تولید

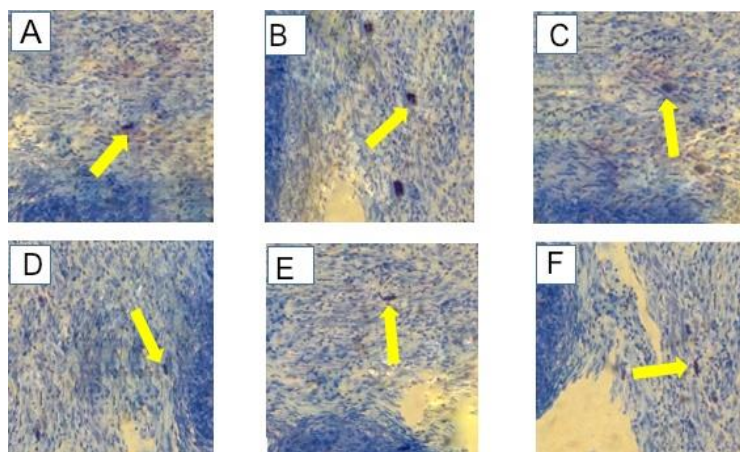
رنگ ارغوانی توسط SOD مهار می شود و با سنجش تغییر رنگ ایجاد شده در طول موج ۵۶۰ نانومتر فعالیت SOD برحسب درصد مهار تولید NBTH2 اندازه گیری شده و میزان این واکنش بر اساس میلی مول در دقیقه بیان می شود (۲۲). داده های حاصله با استفاده از نرم افزار SPSS (Version 16.00, USA) و روش آماری ANOVA یک طرفه و تست تعقیبی توکی Tukey مورد مقایسه آماری قرار گرفتند و اختلاف بین گروه ها در سطح $p < 0.05$ معنی دار توصیف شد و تمامی داده ها با میانگین و معیار خطا نشان داده شدند.

نتایج

در این مطالعه میانگین تعداد ماست سل ها در تخمدان چپ گروه های آزمایشی مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد که میانگین تعداد ماست سل ها در گروه های دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه نسبت به گروه دریافت کننده بوسولفان کاهش داشت و این کاهش دارای اختلاف معنی داری بود ($p = 0.034$ و $p = 0.024$)، و در گروه دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه هم کاهش نشان داد که این کاهش فاقد اختلاف آماری معنی داری بود ($p = 0.504$). ارزیابی های آماری مشخص کرد که میانگین تعداد ماست سل ها در گروه های دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه نسبت به گروه کنترل افزایش داشت که این افزایش فاقد اختلاف معنی داری بود ($p = 0.314$ و $p = 0.999$ و $p = 0.977$). در گروه دریافت کننده کروسین ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه نیز نسبت به گروه کنترل اختلاف آماری معنی داری مشاهده نشد ($P = 1/0$) (نمودار ۱)، (شکل ۱).

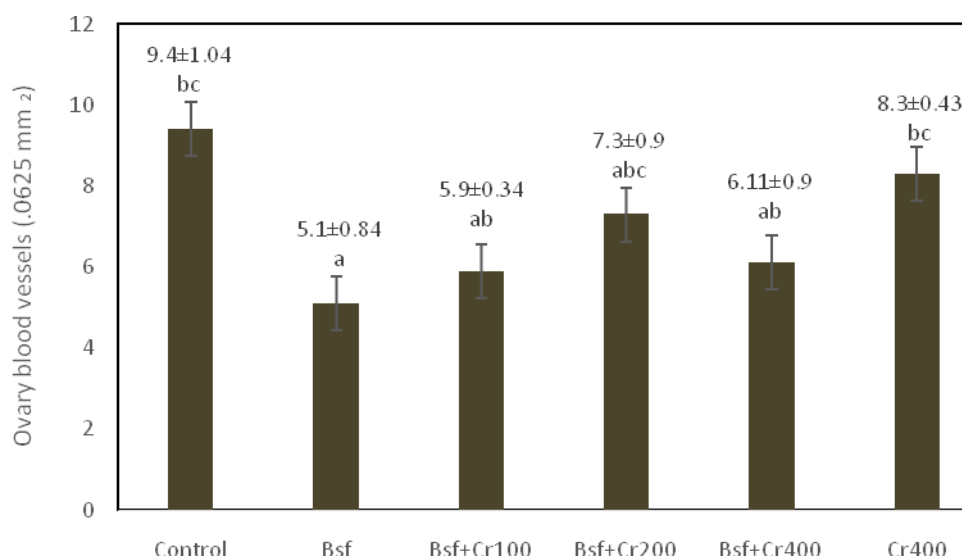


نمودار ۱: مقایسه میانگین تعداد ماست سل ها در تخمدان چپ گروه های مختلف آزمایشی (روش آماری ANOVA یک طرفه و تست تعقیبی توکی Tukey) حروف نامشابه نمایانگر اختلاف معنی دار در سطح $p < 0.05$ می باشند.

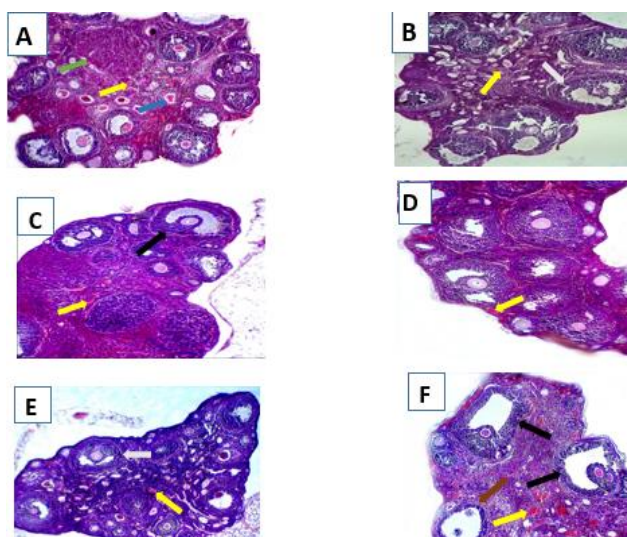


شکل ۱: برش عرضی تخمدان چپ در گروه کنترل (A)، گروه بوسولفان به همراه کروسین ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه (C)، گروه بوسولفان به همراه کروسین ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه (D)، گروه بوسولفان به همراه کروسین ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه (E)، گروه کروسین ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه (F)، که پیکان‌های زرد نشان‌دهنده ماست سل‌ها می‌باشند. (رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو، درشت‌نمایی ۴۰۰X)

مطالعات حاصل از ارزیابی آماری نشان داد که میانگین تعداد عروق خونی در گروه دریافت‌کننده بوسولفان نسبت به گروه کنترل کاهش یافته که این کاهش از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری بود ($p=0/009$). در گروه‌های دریافت‌کننده بوسولفان به همراه کروسین ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه نسبت به گروه بوسولفان افزایش میانگین تعداد عروق خونی دیده شد که این افزایش از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری نبود ($p=0/978$ و $p=0/390$ و $p=0/942$). بین گروه‌های دریافت‌کننده بوسولفان به همراه کروسین ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد ($p=0/808$ و $p=1/000$ و $p=0/891$). همچنین در گروه دریافت‌کننده کروسین ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه نسبت به گروه کنترل اختلاف آماری معنی‌داری از نظر میانگین تعداد عروق خونی مشاهده نشد ($p=0/919$) (نمودار ۲، شکل ۲).

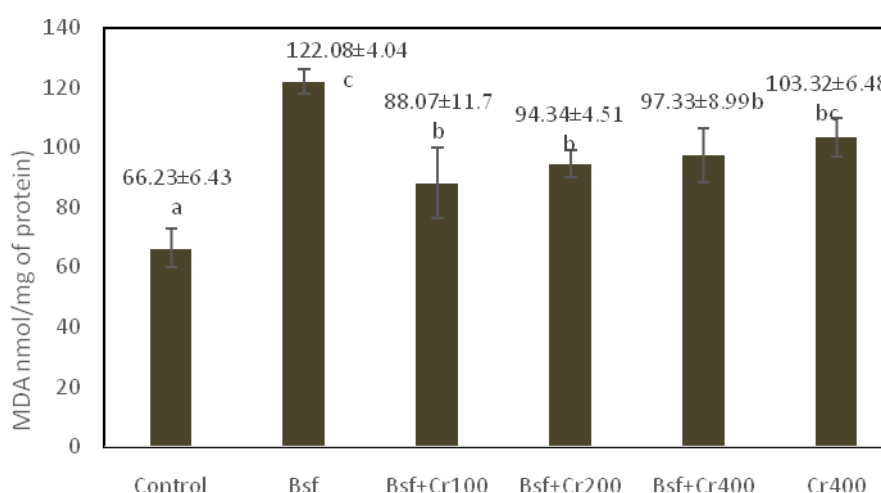


نمودار ۲: مقایسه میانگین تعداد عروق خونی تخمدان چپ در گروه‌های آزمایشی (روش آماری ANOVA یک طرفه و تست تعقیبی توکی (Tukey) حروف نامشابه نمایان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0/05$ می‌باشند.



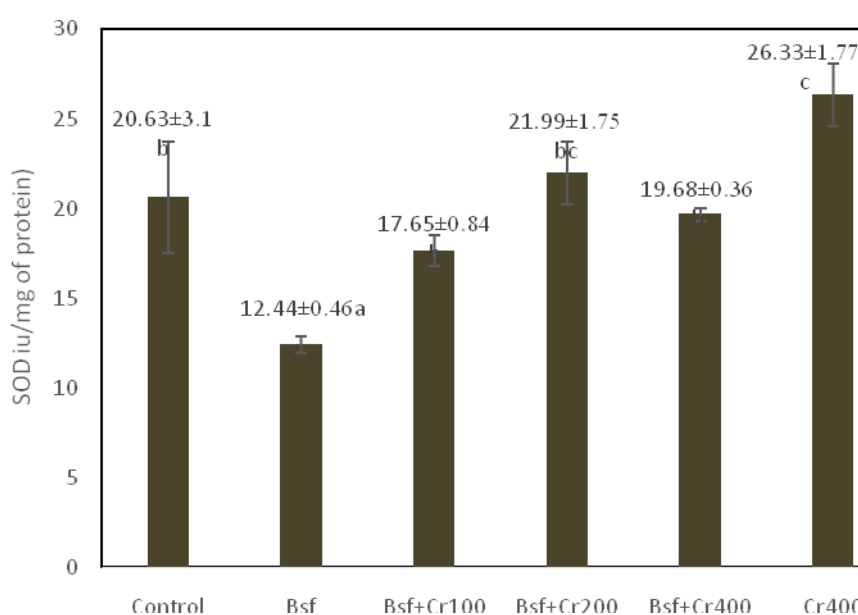
شکل ۲: برش عرضی تخمدان چپ در گروه کنترل (A)، گروه بوسولفان (B)، گروه بوسولفان به همراه کروسین ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه (C)، گروه بوسولفان به همراه کروسین ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه (D)، گروه بوسولفان به همراه کروسین ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه (E)، گروه کروسین ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه (F) که پیکان‌های قرمز نشان دهنده عروق خونی، پیکان‌های سبز نشان دهنده جسم زرد، پیکان‌های آبی نشان دهنده فولیکول آترتیک پیش آنترم، پیکان‌های قهوه‌ای نشان دهنده فولیکول آترتیک آنترم دار، پیکان‌های سفید نشان دهنده فولیکول در حال رشد ثالث و پیکان‌های سیاه نشان دهنده فولیکول در حال رشد بالغ می‌باشند (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، درشت نمایی ۱۰۰X).

نتایج ارزیابی میانگین غلظت مالون دی‌آلدئید در تخمدان راست موش‌های گروه‌های آزمایشی نشان داد که میانگین سطح مالون دی‌آلدئید در گروه دریافت کننده بوسولفان افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشت ($p=0/014$). گروه‌های دریافت کننده بوسولفان به همراه کروسین ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه نسبت به گروه دریافت کننده بوسولفان کاهش نشان داد، ولی فاقد اختلاف معنی دار بود ($p=0/117$ و $p=0/226$ و $p=0/308$). همچنین نشان داده شد که گروه دریافت کننده کروسین ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه نسبت به گروه کنترل دارای افزایش بدون اختلاف معنی داری بود ($p=0/085$)، (نمودار ۳).



نمودار ۳: مقایسه میانگین غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA) تخمدان راست در گروه‌های مختلف آزمایشی (روش آماری ANOVA یک طرفه و تست تعقیبی توکی (Tukey) حروف نامشابه نمایان گر اختلاف معنی دار در سطح $p < 0/05$ می‌باشند.

بررسی نتایج مطالعه حاضر نشان داد میانگین سطح آنزیم SOD سرم در گروه دریافت‌کننده بوسولفان کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل دارد ($p=0/000$). مطالعات بعدی مشخص کرد که میانگین سطح آنزیم SOD در گروه‌های دریافت‌کننده بوسولفان به همراه کروسین ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه نسبت به گروه دریافت‌کننده بوسولفان افزایش یافته بود که دارای اختلاف معنی‌دار بودند ($p=0/014$ و $p=0/000$ و $p=0/001$). هر سه گروه دریافت‌کننده بوسولفان به همراه کروسین ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه نسبت به گروه کنترل فاقد اختلاف معنی‌داری بودند ($P=0/294$ و $P=0/914$ و $P=0/980$). ارزیابی‌ها نشان داد که گروه دریافت‌کننده کروسین ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه از نظر سطح آنزیمی SOD در سرم نسبت به گروه کنترل افزایش داشت که این افزایش دارای اختلاف معنی‌داری بود ($p=0/007$) (نمودار ۴).



نمودار ۴: مقایسه میانگین غلظت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) سرم در گروه‌های آزمایشی مختلف (روش آماری ANOVA یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی (Tukey) حروف نامشابه نمایان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0/05$ می‌باشند.

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که میانگین تعداد ماست سل‌ها به‌عنوان سلول‌های پیش‌التهابی در بافت تخمدان گروه دریافت‌کننده Bsf به‌طور معنی‌دار نسبت به گروه‌های کنترل و دریافت‌کننده Bsf+Cr به‌خصوص کروسین با دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن افزایش معنی‌دار نشان داد. این یافته نشان‌دهنده اثر التهابی Bsf بر بافت تخمدان بوده و کروسین دارای اثر محافظتی قابل ملاحظه‌ای می‌باشد. در همین راستا بررسی میزان MDA به‌عنوان شاخص استرس اکسیداتیو در بافت تخمدان نشان داد که در گروه Bsf نسبت به گروه‌های درمان شده با کروسین به‌طور معنی‌دار بیشتر بوده و این یافته نیز اثر محافظتی کروسین را در برابر Bsf به اثبات می‌رساند. همچنین بررسی میزان آنزیم SOD به‌عنوان عامل دفاع سلولی در برابر رادیکال‌های آزاد (۲۳) در سرم خون گروه‌های درمان شده با کروسین نسبت به گروه Bsf افزایش معنی‌دار نشان داد، که این یافته نیز حاکی از وجود اثر محافظتی کروسین بر روی بافت تخمدان می‌باشد. به‌طور کلی نشان داده شده است که گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species) در سلول می‌توانند باعث اختلال در عملکرد

سیستم آنتی‌اکسیدانتی شده و منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو (Oxidative Stress) میشود (۲۴، ۲۵). لذا در مطالعه حاضر، استرس اکسیداتیو ایجاد شده در گروه دریافت کننده بوسولفان موجب افزایش میانگین تعداد ماست سل‌ها به عنوان سلول ترشح کننده واسطه‌های شیمیایی التهابی مانند هیستامین و هپارین گردید. آزاد شدن هیستامین و فاکتورهای کموتاکتیک در پاسخ به استرس‌های حاد فیزیکی و شیمیایی به وسیله ماست سل‌های دگرانوله شده، باعث افزایش نفوذپذیری عروق خونی و فراخونی سلول‌های ایمنی می‌شود (۲۶، ۲۷). مطالعات نشان داده افزایش ماست سل‌ها با نابرابری در جنس نر نیز در ارتباط است (۲۸). در مطالعات و تحقیقات قبلی عصاره گل زعفران تاثیرات آنتی‌اکسیدانتی و ضدالتهابی مشابهی را نشان داده بود (۲۹). آسیب‌های شدید به DNA متعاقب استرس اکسیداتیو، روند رونویسی RNA و در نهایت سنتز پروتئین‌های ضروری در سلول‌ها را دچار اختلال می‌کند و سلول‌ها دچار آپوپتوز می‌گردند (۳۰). افزایش بیش از حد تراکم ROS به دنبال استفاده بعضی از داروها همانند بوسولفان نیز باعث استرس اکسیداتیو می‌شود (۳۱، ۳۲).

لازم به ذکر است که افزایش مقاطع عروقی به معنای افزایش واسکولاریته می‌باشد، یعنی هم عروق تخمدان افزایش یافته و هم جریان خون بافت تخمدان بهبود پیدا کرده است. بنابراین آنتی‌اکسیدانت‌ها با کاهش تنش اکسیداتیو باعث آنژیوژنز در بافت‌های مختلف می‌شود (۳۳) و ارزیابی نتایج این مطالعه نشان می‌داد که کروسین با افزایش خون‌رسانی و رگ‌زایی بافت تخمدان می‌تواند سبب افزایش فعالیت تخمدان از لحاظ عملکردی گردد که این فرایند تاثیر مثبت بر روند فعالیت تولید مثلی جنس ماده دارد.

همان‌طور که بیان شد، در ارزیابی‌های بیوشیمیایی مطالعه حاضر مشخص شد که بوسولفان غلظت مالون‌دی‌آلدئید تخمدان را به صورت معنی‌داری افزایش داد. استرس اکسیداتیو از طریق مکانیسم‌هایی مانند پراکسیداسیون لیپیدها، آسیب اکسیداتیو پروتئین و DNA باعث آسیب سلولی می‌شود (۳۴). یکی از محصولات جانبی پراکسیداسیون لیپیدی، MDA می‌باشد که به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی مطرح می‌باشد (۳۵). در حقیقت MDA جهت ارزیابی میزان آسیب پراکسیداتیو لیپیدی کاربرد دارد (۳۶). مولکول‌های مالون‌دی‌آلدئید با نفوذ به درون ساختار غشا سلول، موجب عدم تقارن در توزیع اجزای لیپیدی غشا می‌گردند. با توجه به این که پراکسیداسیون لیپیدی یک فرآیند به واسطه رادیکال‌های آزاد است، بنابراین بوسولفان با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود و گسترش پراکسیداسیون لیپیدی منجر به تخریب در غشا شده و نیز اکسیداسیون اسیدهای چرب و غیراشباع در غشاهای بیولوژیکی ممکن است باعث اختلال در عملکرد غشا، کاهش سیالیت آن، غیرفعال کردن گیرنده‌های غشا و افزایش نفوذپذیری غیراختصاصی به یون‌ها و اختلال در ساختار غشا گردد (۳۷). در مطالعه حاضر مشخص شد که کروسین با دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانتی توانست از آسیب‌های وارده به غشا در اثر دریافت بوسولفان بکاهد و در نتیجه باعث کاهش MDA گردد.

بوسولفان مورد استفاده در شیمی درمانی باعث تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود و یکی از اثرات تولید رادیکال‌های آزاد در یک محیط بیولوژیکی مثل سلول، حمله به اسیدهای چرب غیراشباع موجود در ساختمان غشا سلولی است که می‌تواند باعث پارگی غشاء سلول، بروز نکروز و در نهایت فیروز بافتی شود. واکنش رادیکال‌های آزاد با زنجیره‌های اسیدهای چرب غیراشباع فسفولیپیدها منجر به شکستن پیوندهای دوگانه آن‌ها، پراکسیداسیون و تخریب غشاهای لیپیدی می‌شود (۳۸). مالون‌دی‌آلدئید محصول نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب است و سنجش میزان مالون‌دی‌آلدئید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در تعیین میزان رادیکال‌های آزاد از اهمیت بالینی ویژه‌ای برخوردار می‌باشد (۳۹). طبق مطالعات انجام گرفته گیاهان دارویی مثل کروسین به عنوان مکمل و یا جایگزین مناسب جهت کاهش عوارض داروهای شیمی درمانی مورد استفاده در درمان سرطان، گزینه مناسبی هستند زیرا طی تحقیقات انجام شده ترکیبات موجود در گیاهان دارویی می‌تواند عوارض داروهای شیمی درمانی را کاهش داده و ناهنجاری‌های ناشی از آن‌را تا حدودی اصلاح نمایند. لذا، استفاده از کروسین

در مطالعه حاضر موجب کاهش معنی‌دار سطح MDA در بافت تخمدان شد و این نشان دهنده نقش محافظتی کروسین در برابر استرس اکسیداتیو حاصل از بوسولفان می‌باشد.

با توجه به این که استرس اکسیداتیو در نتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن از قبیل آنیون سوپراکسید، رادیکال آزاد هیدروکسیل، هیدروژن پراکسید از یک طرف و تضعیف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی از طرف دیگر ایجاد می‌شود، بنابراین استرس اکسیداتیو باعث ایجاد اثرات مخرب روی ماکرومولکول‌ها از جمله DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها می‌گردد (۴۰). در سیستم‌های بیولوژیکی هوازی برای مقابله با رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن، مکانیسم‌های دفاعی طراحی شده است تا اثرات زیان‌بار این عوامل مهاجم را خنثی نموده یا به حداقل برسانند. برخی از اجزای سیستم دفاعی شامل آنزیم‌ها مانند سوپراکسید دیسموتاز، گلووتاتیون پراکسیداز، کاتالازها هستند که در داخل بدن سنتز می‌شوند، ولی برخی دیگر از اجزای این سیستم مانند ویتامین E، بتاکاروتن باید از طریق رژیم غذایی تامین شوند (۴۱). آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی سیستم‌های اصلی دفاعی بدن در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد هستند (۴۲). خصوصیت مهم این آنزیم‌ها، قابل‌الفا بودن آن‌ها تحت شرایط استرس اکسیداتیو است (۴۳). آنیون سوپراکسید اولین رادیکال آزاد مشتق از اکسیژن است که به‌وسیله SOD به اکسیژن و پراکسید هیدروژن خنثی می‌شود. آنزیم‌های کاتالاز (Catalase) و گلووتاتیون پراکسیداز (Glutathione Peroxidase) موجب تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌شوند (۴۴). مجموعه آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز به‌علت اثرات مهاری بر تشکیل رادیکال‌های اکسیژن اولین خط دفاعی سلول در برابر مسمومیت ناشی از رادیکال‌های آزاد هستند و مواجهه سلول با استرس اکسیداتیو منجر به القای آن‌ها می‌شود (۴۵، ۴۶). در مطالعه حاضر مشخص شد که کروسین به‌دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانتی و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و از دسترس خارج کردن آن‌ها برای واکنش‌های اکسیداتیو، از خواص اکسیداتیو بوسولفان می‌کاهد و آنزیم SOD که وظیفه جمع‌آوری یون سوپراکسید افزایش یافته توسط بوسولفان و خنثی‌سازی آن‌را به‌عهده دارد، با مصرف کروسین افزایش می‌یابد. همچنین مطالعه حاضر نشان داد که میانگین تعداد ماست سل‌ها در بافت تخمدان به‌عنوان یکی از سلول‌های شاخص التهاب بافتی، با استفاده از کروسین در شرایط استرس اکسیداتیو کاهش می‌یابند، ولی جهت اثبات کامل این موضوع مطالعه سایر سلول‌های التهابی مانند، انواع لکوسیت‌ها و عوامل بیوشیمیایی مربوطه همانند، عوامل استرس نیتروژاتیو در بافت تخمدان مورد لزوم می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در نتیجه‌گیری نهایی از این مطالعه می‌توان اظهار نمود که با به‌کارگیری کروسین همراه بوسولفان می‌توان اثرات مخرب بوسولفان در بدن را کاهش داد و نتایج حاصل از شیمی درمانی را بهبود بخشید که این می‌تواند با خاصیت از بین‌برندگی رادیکال‌های آزاد و کاهش استرس اکسیداتیو توسط کروسین که یک آنتی‌اکسیدانت می‌باشد، قابل‌توجه باشد. لذا طراحی کارآزمایی‌های بالینی به‌منظور استفاده هم‌زمان کروسین با بوسولفان در شیمی درمانی توصیه می‌شود تا از این طریق بتوان در جهت تولید داروهای مکمل به‌منظور کاهش عوارض ناشی از داروهای ضدسرطانی قدمی مثبت برداشته شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه دکترای تخصصی بافت‌شناسی مقایسه‌ای به‌شماره ثبت ۶-۱۸۳۰-۶۴۰ استخراج شده و با مساعدت‌های کارکنان آزمایشگاه بافت‌شناسی و جنین‌شناسی و معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به انجام رسیده است که از ایشان صمیمانه تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

1. Shahrooz R, Mones Moloody-Tappe, Razi M, Zarei L, Mohammadi V. Investigation of the Effect of Coenzyme Q10 Supplementation on Apoptosis Gene Expression and Oxidative Stress after Busulfan Injection in Rats. *Yafteh*. 2020; 21(4): 118-130.
2. Slattery JT, Risler L.J. Therapeutic drug monitoring of busulfan in hematologic stem cell transplantation. *Ther Drug Monit*. 1998; 20(5): 543-92.
3. Probin V, Wang Y, Bai A, Zhou D. Busulfan Selectively Induces Senescence but Not Apoptosis in W138 Fibroblasts via a p53-Independent but Extracellular Signal- Regulated Kinase38 Mitogen-Activated Protein Kinase- Dependent Mechanism,; *J pharmacol Exp Ther*. 2006; 319(2): 551-60.
4. Giovannini P, Howes MR, Edwards SE. Medicinal plants used in the traditional management of diabetes and its sequelae in Central America: A review. *J Ethnopharmacol*. 2016; 184: 58-71.
5. Chen J, Bhandar B, Kavdia M. Interaction of ROS and RNS with GSH and GSH/GPX Systems. *The FASEB Journal*. 2015; 29: 636-37.
6. Yancey DM, Guichard JL, Ahmed MI, Zhou L, et al, Cardiomyocyte mitochondrial oxidative stress and cytoskeletal breakdown in the heart with a primary volume overload. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2015; 308(6): 651-63.
7. Agarwal A, Durairajanayagam DS du Plesis. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques. An evidence based review. 2014; 12: 112.
8. Bray TM, Bettger WJ. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009; 8(3): 281-91.
9. Rogalska A, Marczak A, Gajek A, Marzena S, et al. Induction of apoptosis in human ovarian cancer cells by new anticancer compounds, epothilone A and B. *Toxicol In Vitro*. 2013; 27 (1): 239-49.
10. Abdullaey FIE-AJ. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. *Cancer Detect Prev*. 2004; 6(28): 426-3221.
11. D'Alessandro AM, Mancini A, Lizzi AR, De Simone A, et al. Crocus sativus stigma extract and its major constituent crocin possess significant antiproliferative properties against human prostate cancer. *Nutr Cancer*. 2013; 65(6): 930- 42.
12. Kim SH, Lee JM, Kim SC, Park CB, et al. Proposed cytotoxic mechanisms of the saffron carotenoids crocin and cancer cell lines. *Bioch Cell Biol*. 2014; 92(2): 105-33.
13. Yang Y, Karakhanova S, Werner J, Bazhin AV. Reactive oxygen species in cancer biology and anticancer therapy. *Curr Med Chem*. 2013; 20(30): 3677-92.
14. Wu Y, Pan R, Geng P. The effect of Crocin against hypoxia damage of myocardial cell and its mechanism. *Chinese J Appl Physiol*. 2010; 26(4): 453-7.
15. Pohanka M. Alzheimer's disease and oxidative stress: a review. *Curr Med Chem*. 2014; 21(3): 356-64.
16. Wang Y, Han T, Zhu Y, Zheng CJ, et al. Antidepressant properties of bioactive fraction from the extract of Crous sativus L. *J Nat Med*. 2010; 64(1): 3013-024.
17. Nam KN, Park YM, Jung HJ, Lee JY, et al. Anti-inflammatory effects of crocin and crocetin in rat brain microglial cells. *Eur J Pharmacol*. 2010; 648(1-3):106-110.
18. Salomi MJ, Nair SC, Panikkar KR. Inhibitory effects of Nigella sativa and saffron (Crocus sativus) on chemical carcinogenesis in mice. *Nutr Cancer*. 1991; 16(1): 67-73.

19. De-Zhi W, Xin-Hua Z, Yu-Lin Y, Xin-Min Z. Optimal dose of busulfan for depleting testicular germ cells of recipient mice before spermatogonial transplantation. *Asian Journal of Andrology* 2010; 12(2): 263–270.
20. Gretchenl HL. *Animal tissue techniques*. 4th Edn., W. H. Freeman and co., Sanfrancisco. 1979; 119-121, 149, 210, 312-313.
21. WG Niehaus Jr, Samuelsson B. Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation. *Eur J Biochem*. 2001; 6(1): 126-30.
22. Yasuda M, Takesue S, Honda M, Nozoe T, et al. Prognostic significance of serum superoxide dismutase activity in patients with gastric cancer. *Gastri ccancer*. 2002; 5(3): 0148-53.
23. Gaytan F, Carrera G, Pinilla F, Aguilar R, et al. Mast cells in the testis, epididymis and accessory glands of the rat: effects of neonatal steroid treatment. *J Androl*. 1989; 10(5): 350-358.
24. Janda J, Nfonsam V, Calienes F, Sligh JE, et al. Modulation of ROS levels in fibroblasts by altering mitochondria regulates the process of wound healing. *Archives of Dermatological Research*. 2016; 308(4): 239-48.
25. Waiz SA, Raies-Ul-Haq M, Dhanda S, Kumar A, et al. Heat stress and antioxidant enzyme activity in bubaline (*Bubalus bubalis*) oocytes during *In vitro* maturation. *International Journal of Biometeorology*. 2016; 0(9): 1357-66.
26. Gupta SC1, Kim JH, Prasad S, Aggarwal BB. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Rev*. 2010; 29(3): 405-34.
27. Stone KD, Prussin C, Metcalfe D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125(2 Suppl 2): S73-S80.
28. Roaiah MM, Khatab H, Mostafa T. Mast cells in testicular biopsies of azoospermic men. *Andrologia* 2007; 39(5): 185-89.
29. Hosseinzadeh H, Younesi HM. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacol* 2002; 2: 7.
30. Liu GY, Sun YZ, Zhou N, Du XM, et al. 3,3'-OH curcumin causes apoptosis in HepG2 cells through ROS-mediated pathway. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016; 112: 157-63.
31. Tripathi A, Chaube SK. Reduction of phosphorylated Thr-161 Cdk1 level participates in roscovitine-induced Fas ligand-mediated apoptosis in rat eggs cultured *in vitro*. *In vitro Cell Dev Biol Anim*. 2015; 51(2): 174–82.
32. Tripathi A, Chaube SK. Roscovitine inhibits extrusion of second polar body and induces apoptosis in rat eggs cultured *in vitro*. *Pharmacol Rep*. 2015; 67(5): 866–74.
33. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility: a clinical perspective. *Hum Reprod Update*. 2008; 14(3): 243-58.
34. Saki F, Beigi M, Sadoughi MA, Adeli OA. The effect of low (7.5 mg/kg) of Aspirin on ovary tissue during implantation period in Mice (NMRI). *Yafte*. 2012; 14(3): 85-90.
35. Radak Z, Inoue A, Kizakit M, Ishis OH, et al. Superoxide dismutase reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *JAPPL Physiol*. 1995; 79: 129-35.

36. De Lamirande E, Leduc BE, Iwasaki A, Hassouna M, et al. Increased reactive oxygen species formation in semen of patients with spinal cord injury. *Fertil Steril*. 1995; 63(3): 637-42.
37. Hernandez-Munoz R, Montiel-Ruiz C, Vazquez-Martinez O. Royal jelly-induced neurite outgrowth from rat pheochromocytoma pc12 cells requires integrin signal independent of activation of extracellular signal-regulated kinase. *Biomed Res*. 2000; 28(3): 139-46.
38. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991; 11(1): 81-128.
39. Cohen G, Riahi Y, Sunda V, Deplano S, et al. Signaling properties of 4-hydroxyalkenals formed by lipid peroxidation in diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2013; 65: 978-87.
40. Chandra K, Salman AS, Mohd A, Sweety R, et al. Protection against FCA induced oxidative stress induced DNA damage as a model of arthritis and In vitro anti-arthritis potential of costus speciosus rhizome extract. *Int J Pharmac Phyt Res*. 2015; 7(2): 383-389.
41. Zarei S, Moradi H, Asadi S, Abbasalipourkair R, et al. Investigating the Effect of Zinc Oxide on Enzymatic Antioxidant Activity in Male Rats. *Pajouhan Scie J*. 2017; 15(3): 29-35.
42. Nordberg J, Arner E. Reactive oxygen species, antioxidant, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*. 2001; 31(11): 1287-312.
43. Oruc EO, Usta D. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2007; 23: 48-55.
44. Mates JM, Perez-Gomez C, Decastro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*. 1999; 32(8): 595-603.
45. John S, Kale M, Rathore N, Bhatnagar D. Protective effect of vitamine E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J Nut Biochem*. 2001; 12(9): 500-504.
46. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell cervical against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 1994; 17(3): 235-48.

The Protective effect of Crocin on Ovary Mast cells, Blood Vessels and Ovary, Serum Biochemical changes following Busulfan-induced Oxidative Stress in Mice.

Hassanzadeh Khanmiri H, Ph.D., Shahrooz R, Ph.D.* , Hassanzadeh Sh, Ph.D., Najafi Gh, Ph.D.

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

* Email corresponding author: r.shahrooz@urmia.ac.ir

Received: 11.Jun. 2019

Accepted: 5 Jul. 2020

Abstract

Aim: The purpose of this research was aimed to evaluate the protective effects of crocin, as an antioxidant agent on Mast cells, blood vessels and biochemical changes of ovary and serum in Busulfan-induced oxidative stress in Mice.

Material and Methods: Thirty mature 6-8 weeks aged female NMRI mice in the weight of 22-25 g were randomly divided into 6 groups, and treated for 21 days. The control group only received solvent of Busulfan (BSF) (0.1 ml) intraperitoneally, and BSF group received only Busulfan (10 mg kg⁻¹, IP/single dose). The experimental groups no. 1, 2, 3 received BSF (10 mg kg⁻¹ /single dose) with crocin (100, 200, 400 mg kg⁻¹ /day, IP) and positive group only received crocin (400 mg kg⁻¹, IP/day). At the end of treatment period, animals were euthanized and left ovary were studied for Mast cells, ovary blood vessels, and Serum, and right ovary for biochemical evaluations. Data was subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey to determine if significant difference ($P \leq 0.01$) existed among the observed results using SPSS.

Results: Busulfan significantly ($P \leq 0.01$) increased mast cells and MDA, while decreased ovary blood vessels and SOD rate, significantly ($P = 0.000$) in comparison to control group. However, crocin in all the used doses, especially in the dose of 200 mg kg⁻¹, significantly decreased the adverse effects of Busulfan.

Conclusion: The results indicated that crocin can protect ovaries against Busulfan induced damages, and it can be considered as a suitable drug for reducing the toxic effects of Busulfan in chemotherapy.

Keywords: Crocin, Busulfan, Ovary, Oxidative stress, Mice