Journal of Cell and Tissue 13(4) (2022) 248-256

Journal of Cell and Tissue
http://jct.araku.ac.ir

Investigating the Effect of Atorvastatin on the Rate of Apoptosis in Mouse Oocytes

Sadeghi M[a], Chegini R[c], Sabbaghziarani F[b], Soleimani P[c], Ashtarimajelan MR[c], Zafari F[b*]

[a] Human Genetics Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[b] Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Prevention of Non-Communicable Diseases, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

[c] Student Research Committee, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.

Original Article

Use your device to scan and read the article online

Citation: Soleimani P, AshtarimajelanMR, Zafari F. Investigating the Effect of Atorvastatin on the Rate of Apoptosis in Mouse Oocytes. Journal of Cell and Tissue. 2022;13(3):248-256.

https://10.52547/JCT.13.3. 248

KEYWORDS

Atorvastatin, Apoptosis, Oocyte

ABSTRACT

Aim: Optimizing cell culture conditions to improve oocyte growth and maturation in vitro culture conditions has been the focus of many researchers today, but the quality improvement mechanism is not fully understood. Apoptosis or programmed cell death is a process to remove old and damaged cells from tissues and plays a major role in the life of follicles and immature oocytes. Most of the defective reproductive cells as well as extra cells are removed from the ovaries through apoptosis. One of the ways to reduce oxidative stress in the laboratory culture of oocyte maturation is the use of antioxidants. Statins are drugs for the treatment of high cholesterol for which antioxidant and anti-apoptotic properties have been reported. Atorvastatin in high doses has side effects for the heart and kidneys, but in low concentrations, it has antioxidant and anti-inflammatory effects for cells, and no side effects have been reported for it.In this study, we investigated the effect of low-dose atorvastatin on the rate of apoptosis in mouse oocytes.

Materials and Method: 24 h after PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) inhection, 200 oocytes were obtained from adult female Wistar rats at the age of 4-5 weeks, were from were divided into 2 groups of 100 including the control group (MEM:Minimum Essential Medium culture+ Growth factor) and the atorvastatin group (MEM culture medium + 2 mg/kg atorvastatin+Growth factor) and cultured in the incubator(35 ^{o}C,CO2 %). After 24 hours of oocyte culture, Matured oocytes that met the standards of a healthy mature oocyte(oocytes that were in the first meiosis and had the first and mature polar body) were isolated the amount of apoptosis in each group was checked using tunnel staining and fluorescent microscope, the data were analyzed by variance analysis.

* Corresponding author. Tel. , Fax: +98 2833336001-5
E-mail address: f.zafari@qums.ac.ir
DOI: https://10.52547/JCT.13.3.248
Received: Jun 8, 2022; Received in revised form: 19 Oct, 2022; Accepted: Nov 13, 2022
© Author

Results: After 24 hours of oocyte culture, the amount of apoptosis in the group receiving atorvastatin in the culture medium and the control group was investigated. The rate of apoptosis in the atorvastatin group and the control group was 24% and 22%, respectively, In the atorvastatin group, apoptosis increased by 2% compared to the control group butt the difference between the two groups was not statistically significant (p =0.11).

Conclusion: According to the findings of this study, atorvastatin in low doses can have a pro-apoptotic effect and cause partial induction of apoptosis in mouse oocytes in a laboratory environment. Although this study was not conducted on other doses of atorvastatin, it is suggested that the effect of other doses of this drug on the rate of apoptosis induction should be investigated in order to make an evidence-based decision regarding its administration and use.

سلول و بافت، دوره ۱۳، شماره ۴، سال ۱۴۰۱، صفحات ۲۴۸تا ۲۵۶

سلول و بافت

بررسی تاثیر اتورواستاتین بر میزان آپوپتوزیس در تخمک‌های موش

مرتضی صادقی[۱]، راضیه چگینی[۲]، فاطمه صباغ زیارانی[۳]، پوریا سلیمانی[۴]، محمدرضا اشتری ماجلان[۵]، فریبا ظفری[۶*]

[۱]استادیار ژنتیک، ، تهران، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، پژوهشگاه ژنتیک

[۲]کارشناس ارشد آناتومی.کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

[۳]استادیار علوم تشریح، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده پیشگیری از بیماری های غیر واگیر، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

[۴]دانشجوی پرستاری. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

[۵] کارشناس ارشد آناتومی.کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

[۶]استادیار علوم تشریح، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده پیشگیری از بیماری های غیر واگیر، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران، zafari@qums.ac.ir

واژگان کلیدی

آتورواســـتاتین، آپوپتوز، تخمک

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۱۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۷/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۲۲

چکیده

هدف: بهینه سازی شرایط کشت سلول برای بهبود رشد و بلوغ تخمک در IVM (In Vitro Maturation) در شرایط کشت داخل آزمایشگاهی IVF(In Vitro Fertilization) امروزه مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است، اما مکانیسم بهبود کیفیت کاملاً درک نشده است. آپوپتوزیس یا مرگ سلولی برنامه ریزی شده فرایندی برای حذف سلول‌های پیر و آسیب دیده از بافت‌ها است و در حیات فولیکول‌ها و تخمک‌های نارس نقش عمده‌ای دارد، اکثر سلول‌های زایشی معیوب و همچنین سلول‌های اضافی از طریق آپوپتوزیس از تخمدان‌ها حذف می‌شوند. یکی از راه‌های کاهش تنش اکسیداتیو در محیط کشت آزمایشگاهی بلوغ تخمک، استفاده از آنتی اکسیدان‌ها می‌باشد. استاتین ها داروهای درمان کلسترول بالا هستند که خواص آنتی اکسیدانتی و آنتی آپوپتوتیک برای آن گزارش شده است، آتورواستاتین در غلظت‌های بالای دارای عوارض جانبی برای قلب و کلیه‌ها است ولی در غلظت پایین دارای اثرات آنتی اکسیدانتی و ضد التهابی برای سلول‌ها است و عوارض جانبی برای آن گزارش نشده است. در مطالعه ای مشابه که توسط همین گروه انجام شد در محیط حاوی دوز پائین از آتورواستاتین(۲ میکرومولار) میزان بلوغ و رشد تخمک ها به طور معنی داری افزایش داشت بنابراین در این مطالعه بر آن شدیم که به بررسی تاثیر این دوز آتورواستاتین بر میزان آپوپتوزیس در تخمک‌های موش صحرایی بپردازیم. **مواد و روش ها:** ۲۰۰ عدد تخمک ۲۴ ساعت بعد از تزریق ۷/۵ واحد PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin)، از تخمدان‌های موش‌های صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار در محدوده وزنی ۴ تا ۵ هفته، خارج و در ۲ گروه ۱۰۰ تائی شامل گروه کنترل (محیط کشت MEM:Minimum Essential Medium + فاکتور رشد Growth factor) وگروه آتورواستاتین (محیط کشت MEM + ۲ mg/kg آتورواستاتین+ فاکتور رشد Growth factor) تقسیم بندی و داخل انکوباتور(با دمای ۳۵ درجه و 5%CO2) کشت داده شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت، تخمک های بالغ شده که دارای

* نویسنده مسئول؛ تلفن:۰۲۱-۲۱۲۳۵۶۲۵۰۷؛ فکس: ۰۲۱ ۲۱۲۳۵۶۲۵۰۷

آدرس پست الکترونیک:eslami@royaninstitute.org

استانداردهای یک تخمک بالغ و سالم بودند (تخمک‌هایی که میوز اول را طی کرده و دارای جسم قطبی اول و بالغ شده بودند) جدا شده و میزان آپوپتوزیس در هر گروه با استفاده از رنگ آمیزی تانل بررسی و سپس با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده و عکسبرداری شد، داده‌ها توسط آزمون آنالیز واریانس تجزیه و تحلیل شد. **نتایج:** بعد از گذشت ۲۴ ساعت از کشت تخمک‌ها میزان آپوپتوزیس در گروه دریافت کننده آتورواستاتین در محیط کشت و گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. میزان آپوپتوزیس در گروه کنترل و گروه آتورواستاتین به‌ترتیب برابر ۲۲ و ۲۴ درصد بود که نشان می‌داد آتورواستاتین با غلظت ۲ میکروگرم بر کیلوگرم باعث افزایش ۲ درصدی میزان آپوپتوزیس در تخمک‌های موش می‌شود که این افزایش در مقایسه با گروه کنترل از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (p=۰/۱۱). **بحث**: طبق یافته‌های این مطالعه آتورواستاتین در دوزهای پائین می‌تواند به‌صورت پروآپوپتوتیک اثر کند و باعث القای جزئی آپوپتوزیس در تخمک‌های موش در محیط آزمایشگاهی شود. اگرچه این مطالعه بروی دوزهای دیگر آتورواستاتین انجام نشد ولی پیشنهاد می شود اثر سایر دوزهای این دارو بروی میزان القای آپوپتوزیس مورد بررسی قرار گرفته تا در خصوص نحوه تجویز و استفاده از آن تصمیم گیری مبتنی بر شواهد انجام شود.

۱- مقدمه

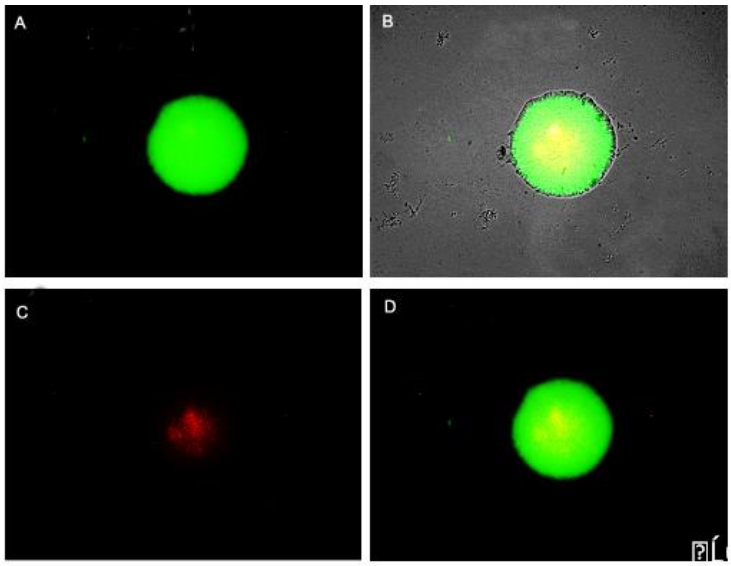
ناباروری یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشت جهانی است که حدود بیست درصد از زوج‌های جوان را در سراسر جهان تحت تاثیر قرار داده است و علاوه بر پیشرفت چشمگیر روش‌های درمانی و بهبود در بخش سلامت تولید مثل میزان ناباروری در طی دو دهه گذشته همچنان رو به افزایش است (۱). از مهم‌ترین عوامل موثر بر ناباروری می‌تواند به محیط زیست، استرس، سبک زندگی، عوامل هورمونی و فاکتورهای پاتوفیزیولوژیک اشاره کرد (۲). افزایش استرس باعث تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در سطح تخمدان‌ها می‌شود که خود یکی از عوامل حذف سلول‌های زایا از طریق القای آپوپتوزیس است (۳و ۴). تعداد زیادی از سلول‌های زایشی قبل از بلوغ از تخمدان حذف می‌شوند و در دوران بلوغ کمتر از ۱ درصد از سلول‌های زایشی در تخمدان‌هایی که برای کل طول عمر تولید مثلی فرد لازم هستند باقی می‌ماند (۵). آپوپتوزیس یا مرگ سلولی برنامه ریزی شده فرایندی برای حذف سلول‌های پیر و آسیب دیده از بافت‌ها است و در حیات فولیکول‌ها و تخمک‌های نارس نقش عمده‌ای دارد، اکثر سلول‌های زایشی معیوب و همچنین سلول‌های اضافی از طریق آپوپتوزیس از تخمدان‌ها حذف می‌شوند (۶). افزایش سطح هورمون استرس و ROS ها نه تنها در سلول‌های گرانولوزا بلکه در تخمک‌های فولیکولی نیز باعث بروز آپوپتوزیس می‌شود. آپوپتوزیس نقش عمده ای در تعیین کیفیت تخمک‌های فولیکولی بازی می‌کند و به‌طور مستقیم بر تولید مثل تاثیر می‌گذارد و تحریک آپوپتوزیس می‌تواند یکی از عوامل داخل سلولی حذف تخمک‌ها و ایجاد ناباروری باشد (۷).

آتورواستاتین یکی از داروهای گروه استاتین‌ها است که به‌طور رایج برای کاهش کلسترول خون استفاده می‌شود، استاتین‌ها از طریق فعال کردن مسیر پروتئین NADPH و مهار هیدروکسی متیل گلوتاریل کوآنزیم A ردوکتاز (HMG-CoA) سطح سرمی کلسترول را کاهش می‌دهند (۸). بر اساس گزارش‌های منتشر شده مصرف دوزهای پایین آتورواستاتین برای طولانی مدت بدون عوارض بوده و خطرات و آسیب‌های قلبی عروقی ناشی از هیپرکلسترمی را در بیمار کاهش می‌دهد و اثرات محافظتی بر روی سلول‌های جنسی دارد (۹و۱۰) به‌نظر می‌رسد بیشتر این اثرات به‌خاطر خاصیت مهارکنندگی ROS ها باشد، ولی مصرف دوزهای بالاتر می‌تواند با عوارضی از جمله عوارض قلبی برای فرد همراه باشد (۱۱). علاوه بر کاهش میزان کلسترول اثرات متنوع دیگری از جمله اثرات ضد التهابی، آنتی اکسیدانتی و اثرات آنتی آپوپتوزی نیز برای آتورواستاتین گزارش شده است (۱۲). با توجه به عملکرد آنتی اکسیدانتی آتورواستاتین و پتانسیل‌های مختلف آن و از طرفی روشن نبودن تاثیرات دقیق دوزهای مختلف آن بر عملکرد سلول‌های جنسی در این مطالعه ما تصمیم به بررسی تاثیر دوز ۲ mg/kg آتورواستاتین بر میزان آپوپتوزیس تخمک‌های موش در محیط آزمایشگاهی گرفته شد.

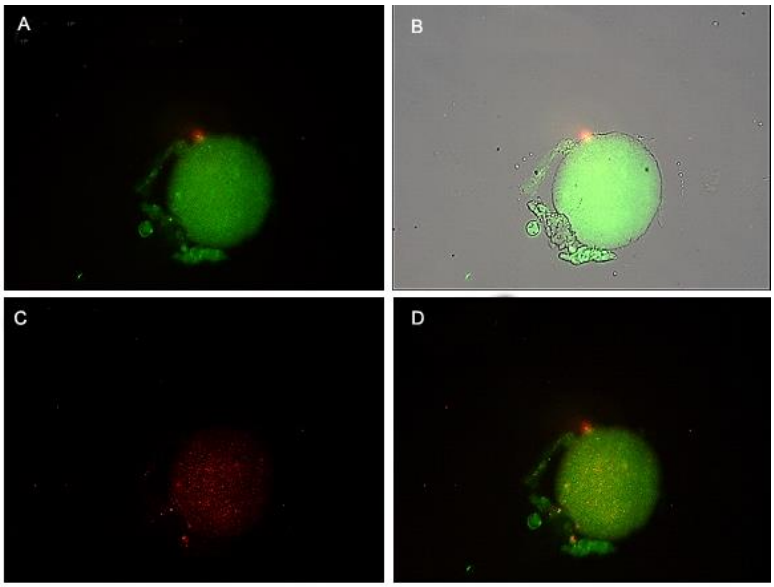
۲- مواد و روش‌ها

جمع آوری و کشت تخمک: در این مطالعه مورد شاهدی از ۲۰۰ تخمک استفاده شد که از ۴۰ سر موش ماده نژاد ویستار، با سن ۴ تا ۵ هفته‌ای تهیه شدند، برای تهیه تخمک‌ها ۲۴ ساعت بعد از تزریق PMSG موش‌ها با کشش گردنی معدوم شدند، تخمدان‌ها برداشته شدند در مرحله بعد تخمک‌های GV به‌دست آمده از تخمدان موش در دیش محیط کشت حاوی ۱۰ میکرومول آتورواستاتین قرار داده شدند و نهایتا به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2، ۵ درصد منتقل شدند.۲۰۰ تخمک پس از استخراج و قرار گرفتن در محیط کشت ۵۰ میکرو لیتری به‌دو گروه مساوی زیر تقسیم شدند، گروه کنترل: محیط کشت+ فاکتور رشد. گروه آتورواستاتین: محیط کشت + فاکتور رشد + ۲ میکرو مولار آتورواستاتین. تخمک‌ها در هر گروه ۲۴ ساعت داخل انکوباتور قرار گرفتند.

بررسی میزان آپوپتوزیس: برای بررسی آپوپتوزیس با استفاده از میکروسکوپ اینورت (XDS-2ITALY) تخمک‌هایی که میوز اول را طی کرده و دارای جسم قطبی اول و بالغ شده بودند شمارش و عکس‌برداری شدند، در مرحله بعد میزان آپوپتوزیس تخمک‌ها با استفاده از رنگ آمیزی تانل در دو گروه کنترل و گروه آتورواستاتین بررسی شدند (شکل ۱و ۲)، جهت انجام آزمایش تانل از کیت تشخیص تانل In situ cell death detection kit(Germany, Roche) استفاده شد، برای این منظور پس از شستشو نمونه‌ها با PBS نمونه‌ها با سوبسترای DAB انکوبه شدند و جهت رنگ آمیزی نهائی از تولوئیدن بلو استفاده شد. در نهایت لام‌ها با میکروسکوپ نوری جهت تشخیص سلول‌های آپوپتوتیک تغییر رنگ یافته مورد بررسی قرار گرفتند.



شکل ۱: رنگ آمیزی تانل در تخمک‌های کشت داده شده با آتورواستاتین (بزرگنمائی برابر با ۳۰۰x). A: رنگ آمیزی تانل برای نشان دادن شکست DNA ، B: رنگ آمیزی PI برای رنگ زمینه اووسیت، C: تصویر تلفیقی A و B، که DNA شکسته شده به رنگ سبز مایل به زرد مشاهده می‌شود.



شکل ۲: رنگ آمیزی تانل تخمک های گروه کنترل. A: رنگ آمیزی تانل برای نشان دادن شکست DNA ، B: رنگ آمیزی PI برای رنگ زمینه اووسیت، C: تصویر تلفیقی A و B، که DNA شکسته شده به رنگ سبز مایل به زرد مشاهده می‌شود (بزرگنمائی برابر با ۳۰۰x).

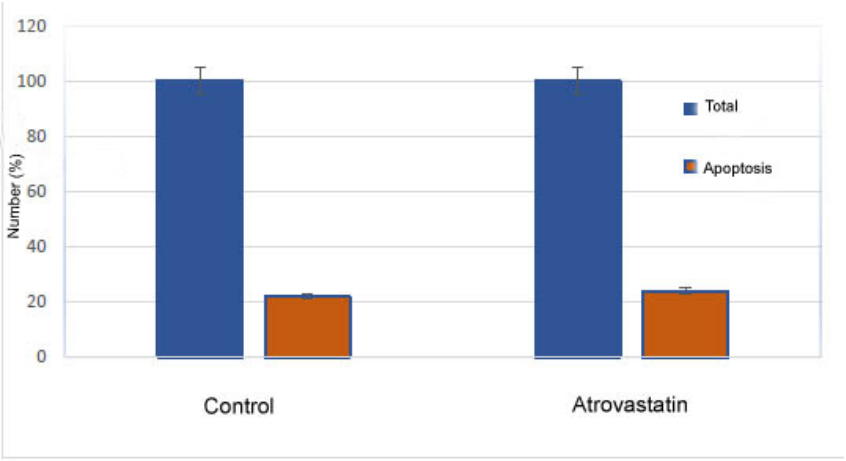
۳-آنالیز آماری

به‌منظور آنالیز آماری تصاویر دو گروه با استفاده از نرم‌افزار image j آنالیز شد و داده‌های دو گروه توسط تست کای دو و نرم افزار spss12 آنالیز آماری شد، داده‌ها حاصل از گروه‌ها توسط آزمون Way- One ANOVA بین گروه‌ها مورد مقایسه قرارگرفت، در تمامی محاسبات $p\leq ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

۴- نتایج

میزان آپوپتوزیس تخمک‌ها

برای بررسی میزان آپوپتوز تخمک‌ها رنگ‌آمیزی تانل بر روی ۱۰۰ تخمک بالغ از هر گروه انجام شد، تصاویر ۱و۲ توسط میکروسکوپ فلئورسانس تانل مثبت و منفی را نشان می‌دهد. از بین ۱۰۰ تخمک گروه کنترل در ۲۲ تخمک آپوپتوزیس مشاهده شد (۲۲ درصد) از ۱۰۰ تخمک گروه آتورواستاتین آپوپتوزیس در ۲۴ تخمک مشاهده شد (۲۴ درصد). میزان آپوپتوزیس در گروه کنترل و گروه آتورواستاتین به‌ترتیب برابر ۲۲ و ۲۴ درصد بود که نشان می‌داد آتورواستاتین با غلظت ۲ میکروگرم بر کیلوگرم باعث افزایش ۲ درصدی میزان آپوپتوزیس در تخمک‌های موش می‌شود که این افزایش در مقایسه با گروه کنترل از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p = ۰/۱۱$) (شکل ۱).



شکل۱: نمودار میزان آپوپتوزیس و بلوغ تخمک‌ها در دو گروه کنترل و آتورواستاتین ۲۴ ساعت پس از کشت آزمایشگاهی

۵- بحث

در این مطالعه به بررسی تاثیر غلظت ۲ mg/kg داروی آتورواستاتین در آپوپتوزیس تخمک‌های موش در محیط آزمایشگاهی پرداخته شد. نتایج این مطالعه نشان داد که آتورواستاتین در غلظت پائین باعث افزایش جزئی آپوپتوزیس در تخمک‌های موش می‌شود. میزان تکوین تخمک‌های نارس در محیط‌های خارج رحم یکی از فاکتورهای کلیدی در میزان موفقیت تکنیک های باروری خارج رحمی (IVF) است، عدم وجود فاکتورهای رشد کافی در طی مراحل رشد و تقسیمات اولیه تخمک و به‌خصوص در مرحله پروفاز۱ سبب فعال شدن اولین موج آپوپتوزیس در اووسیت‌ها می‌شود، دومین موج آپوپتوزی وقتی که تخمک‌ها به بلوک دیپلوتن می‌رسند و در هنگام تشکیل اولین جسم قطبی رخ می‌دهد (۱۳-۱۵). آتورواستاتین در غلظت‌های بالای دارای عوارض جانبی برای قلب و کلیه‌ها است ولی در غلظت پایین دارای اثرات آنتی اکسیدانتی و ضد التهابی برای سلول‌ها است و عوارض جانبی برای آن گزارش نشده است (۱۶-۱۸). Sathyapalan و همکاران (۱۹) گزارش کردند که

مصرف آتورواستاتین در بیماران مبتلا به تخمدان پلی کیستیک و هیپراندروژنمی بعد از ۱۲ هفته باعث کاهش التهاب و پارامترهای متابولیک در تخمدان‌ها می‌شود. التهاب یک فرآیند فیزیولوژیکی بسیار مهم در تخمک‌گذاری، قاعدگی و لانه گزینی است و التهاب کنترل نشده اثرات نامطلوبی بر تولید هورمون های جنسی و تخمک‌گذاری دارد (۲۰). از طرف دیگر، در تخمدان‌ها افزایش ROS در طی تخمک گذاری و بلوغ تخمک و رشد جنین بسیار مهم است، ROS با پراکسیداسیون لیپیدها و القای آپوپتوزیس باعث عملکرد نامطلوب تخمدان‌ها می‌شود (۲۱-۲۳). Hamzeh و همکاران (۲۴) گزارش کردند که آتورواستاتین در غلظت ۱۰mg/kg در برابر آسیب تخمدانی ناشی از سیس پلاتین خاصیت آنتی اکسیدانتی و ضد التهابی قوی ایفا می‌کند و باعث کاهش آپوپتوزیس در تخمک‌های موش می‌شود و همچنین گزارش کردند که این اثر می‌تواند از طریق افزایش میزان استروژن و پروژسترون سرمی القا شده توسط آتورواستاتین باشد. ما در مطالعه حاضر در غلظت ۲ mg/kg آتورواستاتین شاهد افزایش جزئی در آپوپتوزیس تخمک‌ها بودیم که این یافته‌ها با یافته‌های حمزه و همکاران (۲۴) هم راستا نبود که به‌نظر می‌رسد دلیل آن استفاده از غلظت پائین‌تر آتورواستاتین در مطالعه ما باشد. در مطالعه‌ای دیگر Doustar و همکاران (۲۵) گزارش کردند که دوز پائین (۱۰ mg/kg) آتورواستاتین باعث کاهش میزان آپوپتوزیس در سلول‌های عضلانی قلب موش می‌شود که این نتایج با نتایج ما بر روی تخمک‌های نارس هم راستا نبود. Aprigliano و همکاران (۲۶) بـه اثـرات آتورواسـتاتین در القـای آپوپتوزیس بر روی سـلول‌هـای میوفیبروبلاست (HSCs) از طریق فعال کردن مسـیر کاسـپاز۳ و ۹ اشاره کردند. آن‌ها در مطالعه خود برای اولین بار اثرات وابسته به دوز آتورواستاتین را گزارش کردند و با اندازه‌گیری میزان آتورواسـتاتین در سـرم خـون بـه ایـن نتیجـه رسیدند که دوز 3-10 lit/mol بیشترین اثرآپوپتوتیک را دارد که این یافته‌ها با یافته‌های مطالعه ما هم راستا بود، طبق یافته‌های ما و یافته‌های Aprigliano داروی آتورواستاین همواره اثرات آنتی اپوپتوتیک ندارد و در مواردی باعث القای آپوپتوزیس می‌شود که این نشانگر اثرات وابسته به دوز این دارو است. بنابراین در مصرف آتورواستاتین باید به‌میزان دوز دقیق مصرف دقت شود به‌طوری‌که به‌نظر می‌رسد آتورواستاتین در دوزهای پائین تر از mg/kg ۵ به‌صورت یک داروی القا کننده آپوپتوزیس اثر می‌کند و در دوزهای بالاتر از این مقدار به‌صورت یک داروی آنتی آپوپتوتیک

۶- نتیجه‌گیری

در یک نتیجه گیری کلی بر اساس یافته‌های ما بر خلاف شناخته شدن آتورواستاتین به‌عنوان یک داروی آنتی آپوپتوتیک آتورواستاتین در دوز پایین می‌تواند باعث القای آپوپتوزیس تخمک‌های موش شود و آتورواستاتین به‌صورت یک داروی وابسته به دوز اثرات متفاوتی دارد.

۷- تشکر و قدردانی

در این قسمت از مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین به‌خاطر فراهم کردن امکانات این مطالعه صمیمانه تشکر می‌شود.

۸- منابع

1. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, et al. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. PLoS Med. 2012;9 (12): e1001356.

2. Prasad S, Tiwari M, Pandey AN, Shrivastav TG, et al. Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome. J Biomed Sci. 2016; 23: 36.

3. Mrazek M, Fulka J. Failure of oocyte maturation: Possible mechanisms for oocyte maturation arrest. Hum Reprod. 2003; 18(11): 2249- 2252.

4. Chaube SK, Prasad PV, Thakur SC, Shrivastav TG. Hydrogen peroxidemodulates meiotic cell cycle and induces morphological features characteristic of apoptosis in rat oocytes cultured in vitro. Apoptosis. 2005; 10(4): 863-874.

5. Tiwari M, Prasad S, Tripathi A, Pandey AN, et al. Apoptosis in mammalian oocytes: A review. Apoptosis; 2015; 20(8): 1019-1025.

6. Myers M, Morgan FH, Liew SH, Zerafa N, et al. PUMA regulates germ cell loss and primordial follicle endowment in mice. Reproduction. 2014; 148(2): 211-219.

7. Barrett SL, Albertini DF. Cumulus cell contact during oocyte maturation in mice regulates meiotic spindle positioning and enhances developmental competence. J Assist Reprod Genet. 2010; 27(1): 29-39.

8. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, et al.The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. N Engl J Med. 1996; 335: 1001-1009.

9. Hamzeh M, Talebpour Amiri F, Karimpour Malekshah A, Yaghubi Beklar S, et al. Protective Effect of Atorvastatin against Cardiotoxicity and Hematotoxicity Induced by Cyclophosphamide in Rat.] J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27: 1-11. (in Persian).

10. Naeimi RA, Talebpour Amiri F, Khalatbary AR, Ghasemi A, et al. Atorvastatin mitigates testicular injuries induced by ionizing radiation in mice. Reprod Toxicol. 2017; 72: 115-121.

11. Parlakgumus HA, Aka Bolat F, Bulgan Kilicdag E, Simsek E, et al. Atorvastatin for ovarian torsion: effects on follicle counts, AMH, and VEGF expression. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2014; 175: 186-190.

12. Steinberg D. Hypercholesterolemia and inflammation in atherogenesis: two sides of the same coin. Mol Nutr Food Res. 2005;49(11):995-8.

13. Kang M, Wook J Ch, Ku JH, Kwak Ch, et al. Inhibition of Autophagy Potentiates Atorvastatin-Induced Apoptotic Cell Death in Human Bladder Cancer Cells in Vitro. Int. J. Mol. Sci. 2014, 15, 8106-8121.

14. Klinger FG, Rossi V, De Felici M. Francesca G. Multifaceted programmed cell death in the mammalian fetal ovary. Int J Dev Biol. 2015;59(1-3):51-4.

15. Kuida K, Haydar TF, Kuan Ch Y, Gu Y, et al. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. Cell, 1998; 94 (3), 325–337.

16. Ene AC , Park S, Edelmann W, Taketo T. Caspase 9 is constitutively activated in mouse oocytes and plays a key role in oocyte elimination during meiotic prophase progression. Dev Biol. 2013; 377(1):213-23.

17. Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic effects of statins: basic research and clinical perspectives. Cir J 2010; 74: 818-826.

18. Crevar-Sakac M, Vujić Z, Kotur-Stevuljević J, Ivanisević J, et al. Effects of atorvastatin and artichoke leaf tincture on oxidative stress in hypercholesterolemic rats. Vojnosanit Pregl. 2016; 73: 178-187.

19. Sathyapalan T, Kilpatrick ES, Coady A-M, Atkin SL. The effect of atorvastatin in patients with polycystic ovary syndrome: a randomized double-blind placebo-controlled study. J Clin Endocrinol Metab. 2009; 94: 103-108.

20. Jabbour HN, Sales KJ, Catalano RD, Norman JE. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. Reproduction. 2009; 138: 903-919.

21. Herath S, Williams EJ, Lilly ST, Gilbert RO, et al. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. Reproduction 2007; 134: 683-693.

22. Shkolnik K, Tadmor A, Ben-Dor S, Nevo N, et al. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. Proc Nati Acad Sci U.S.A. 2011; 108: 1462-1467.

23. Fujii J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. Reprod Biol Endocrinol 2005; 3: 43.

24. Hamzeh M, Hosseinimehr SJ, Mohammadi HR, Yaghubi Beklar S, et al. Atorvastatin attenuates the ovarian damage induced by cyclophosphamide in rat: An experimental study. Int J Reprod Biomed. 2018;16(5):323-334.

25. Doustar Y, Mohajeri D. The anti-apoptotic effects of atorvastatin in isoproterenol induced experimental heart failure. Zahedan J Res Med Sci (ZJRMS)2011; 13(2): 13- 19.

26. Aprigliano I, Dudas J, Ramadori G and Saile B. Atorvastatin induces apoptosis by caspase-9- dependent pathway: an in-vitro study on activated rat hepatic stellate cells. Liver Int. 2008; 28(4): 546- 557.