اثرات عصاره هیدروالکلی پروپولیس بر مهار تغییرات تخمدانی حاصل از شیمی‌درمانی با سیکلوفسفامید در موش صحرایی

عاطفه عرب‌عامری [۱](M.Sc)، شهربانو عریان [۱*](Ph.D)، حمیدرضا ثامنی [۳و۲*](Ph.D)، احمدرضا بندگی [۴](Ph.D)

۱- گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد تهران، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی سیستم عصبی، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۳- گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۴- مرکز تحقیقات فیزیولوژی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۲-۰۲۳ ۳۳۶۵۴۱۷۰ hrsameni@gmail.com-sh_oryan@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۳

چکیده

هدف: یکی ازمخرب‌ترین اثرات جانبی شیمی‌درمانی، آسیب به سیستم تولید مثل می‌باشد. سیکلوفسفامید (CTX) به عنوان یکی از پرمصرف‌ترین داروهای شیمی‌درمانی، دارای اثرات سمی و غیرقابل بازگشتی بر تخمدان می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات عصاره‌ی هیدروالکلی بره موم (پروپولیس) بر بهبود ساختار و عملکرد تخمدان موش صحرایی آسیب‌دیده ناشی از شیمی‌درمانی با سیکلوفسفامید می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش بر روی ۴۰ سر موش صحرایی ماده نژاد Wistar انجام شد (۵ گروه ۸ تایی) شامل: گروه کنترل؛ دریافت فقط حلال پایه (حلال پروپولیس)، گروه شاهد؛ دریافت آب مقطر به‌صورت داخل صفاقی به مدت ۱۴ روز و سیکلوفسفامید یک بار با دوز ۲۰۰mg/kg در روز ۱۵ بارداری، گروه‌های ۳، ۴ و ۵ شامل موش‌هایی که به ترتیب پروپولیس با دوز ۲۰۰mg/kg و ۱۰۰ و ۵۰ (۱۴روز به‌صورت داخل صفاقی) و سیکلوفسفامید یک بار با دوز ۲۰۰mg/kg در روز ۱۵ بارداری دریافت کردند.۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق، خونگیری جهت سنجش میزان هورمون ۱۷بتا-استرادیول سرم انجام شد. سپس تخمدان راست تمام حیوانات جهت مطالعات هیستوپاتولوژیک در محلول بوئن ثابت شده و برش‌های بافتی تهیه و رنگ‌آمیزی انجام شد. تخمدان چپ آن‌ها نیز پس از فریز نمودن، هموژنیزه و سانتریفوژ گردید و از مایع رویی آن برای سنجش فاکتورهای استرس اکسیداتیو TAC و MDA بر اساس روش ذکر شده در کیت‌های مربوطه استفاده شد.

یافته‌ها: استفاده از عصاره هیدروالکلی پروپولیس با دوزهای ۲۰۰mg/kg، ۱۰۰، ۵۰ باعث مهار کاهش تعداد انواع فولیکول‌های تخمدانی و قطر ائوسیت، کاهش تعداد فولیکول‌های آترتیک، افزایش میزان هورمون ۱۷ بتا-استرادیول، افزایش سطح فاکتور آنتی‌اکسیدان کل (TAC) و کاهش سطح مالون دی آلدئید (MDA) در مدل شیمی‌درمانی گردید.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که عصاره‌ی هیدروالکلی پروپولیس به طور قابل ملاحظه‌ای از اثرات مخرب سیکلوفسفامید بر ساختار و عملکرد تخمدان جلوگیری می‌کند.

واژه‌های کلیدی: پروپولیس، فولیکول تخمدان، فولیکول، سیکلوفسفامید، استرس اکسیداتیو

مقدمه

بر اساس آمار ارائه شده از سوی انجمن سرطان ایران، تعداد بیماران سرطانی در سال ۱۳۷۹ از حدود ۱۸۰۰۰ نفر به حدود ۸۵۰۰۰ در سال ۱۳۹۰ رسیده است و شیوع آن در بین زنان ایرانی ۴ برابر متوسط دنیا بوده است. سرطان تخمدان یکی از مباحث مهم در حیطه جراحی است، که نیاز به درمان جدی و غالباً پیچیده دارد و انرژی روانی و فیزیکی بیمار را تحلیل می‌برد. این سرطان نسبت به بدخیمی‌های دیگر دستگاه تناسلی زنان، از بالاترین میزان مرگ و میر برخوردار است. سالانه بیش از ۲۳۳۰۰ مورد جدید از این سرطان در ایالت متحده آمریکا دیده می‌شود و انتظار می‌رود که هر سال ۱۳۹۰۰ زن قربانی این بیماری شوند. خطر بروز سرطان تخمدان در خلال زندگی زنان حدود ۱/۵ درصد و خطر مرگ ناشی از آن تقریباً یک درصد است، این سرطان ششمین سرطان زنان در کشورهای غربی و پنجمین علت مرگ به دلیل سرطان در زنان ایالات متحده آمریکاست و در واقع سرطانی بسیار کشنده است [۱].

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

مطالعات نشان داده‌اند مواد شیمیایی مختلف از جمله، مواد مختل‌کننده غدد درون‌ریز، فلزات سنگین، مواد شیمیایی کشاورزی، دود سیگار، مواد شیمیایی خاص مورد استفاده در پلاستیک، مواد محصولات آرایشی و بهداشتی، داروهای شیمی‌درمانی و غیره بر باروری زنان تأثیر منفی می‌گذارند [۲].

شیمی‌درمانی به‌عنوان یک روش موثر و کارآمد، به صورت گسترده برای درمان انواعی از اختلالات خودایمنی و بدخیمی‌ها استفاده می‌شود و می‌تواند به صورت معناداری موجب بقا و افزایش طول عمر گردد ولی دارای عوارض جانبی بسیاری بوده که قابل چشم‌پوشی نیست [۳]. سیکلوفسفامید (CTX) به عنوان یکی از پرمصرف‌ترین داروهای شیمی‌درمانی است که در درمان سرطان‌ها (از جمله تخمدان) مورد استفاده قرار می‌گیرد ولی دارای اثرات سمی و غیر قابل بازگشتی بر ساختار تخمدان می‌باشد. این دارو به صورت مستقیم اووسیت را تخریب نموده و تخلیه فولیکولی را تحریک می‌نماید. با توجه به اثرات منفی این دارو بر سیستم تولید مثلی، نیاز مبرم به روش‌های درمانی است که بتواند باروری را در زنان جوان تحت شیمی‌درمانی حفظ کند [۳].

در پستانداران، تخمدان‌ها وظیفه مهم و حیاتی تولید سلول‌های زایا (اووسیت‌ها) را به تعداد معین و زمان معین جهت یک تولید مثل موفق به عهده دارند که باعث بقای نسل گونه‌های مختلف می‌گردد. این عملکرد بسیار مهم تخمدان‌ها از طریق یک مکانیسم پیچیده و بسیار هماهنگ از فعالیت‌های سنتزی و ترشحی توسط سلول‌های سوماتیک انجام می‌شود که به وسیله پیام‌های هورمونی صادره از هیپوتالاموس و هیپوفیز قدامی و هم‌چنین مراکز بالاتر مغزی کنترل می‌شود [۴،۵].

یکی از مخرب‌ترین اثرات جانبی شیمی‌درمانی، آسیب به سیستم تولید مثل بوده که در دختران جوان و زنان کم‌تر از ۴۰ سال باعث یائسگی زودرس و ناباروری می‌شود. با توجه به این‌که دختران در زمان تولد دارای تعداد محدودی فولیکول‌های بدوی و تکوین نیافته می‌باشند، داروهای مورد استفاده در این روش در ساختار فولیکول‌های بدوی، اووسیت و تخمدان اختلال ایجاد کرده و می‌تواند منجر به نارسایی زودرس تخمدان(Premature Ovarian Failure, POF) گردد [۵،۴]. از طرفی مشخص شده است سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS)یکی از شایع‌ترین ناهنجاری‌های غدد درون‌ریز بوده و عامل ۷۵ درصد ناباروری ناشی از اختلالات تخمک‌گذاری در سنین باروری به شمار می‌رود [۶].

گزارشات نشان داده‌اند که استرس اکسیداتیو می‌تواند بر روی باروری خانم‌ها و سلامت گامت دارای اثرات منفی مهمی باشد. از طرفی مداخلات دارویی یا تغذیه‌ای ممکن است به عنوان یک استراتژی موثر، باروری خانم‌ها را از اثرات منفی استرس اکسیداتیو حفظ نماید [۷،۸].

با توجه به شیوع بالای سرطان تخمدان در جوامع و استفاده زیاد از شیمی‌درمانی (سیکلوفسفامید) در درمان آن، یافتن آنتی‌اکسیدان مناسب با منشأ مواد طبیعی به منظور به حداقل رساندن اثرات منفی سیکلوفسفامید بر باروری دارای اهمیت زیادی می‌باشد. یک مزیت دیگر درمان با گیاهان و مواد طبیعی به شرط این‌که تحت نظارت ویژه افراد متخصص تهیه و مصرف شوند، بی‌ضرر بودن آن‌ها است [۸،۹].

سیکلوفسفامید از جمله داروهای سیتوتوکسیک است که در کبد تحت تاثیر آنزیم‌های کبدی به متابولیت‌های فعال خود یعنی فسفرآمیدموستارد و آکرولئین تبدیل می‌شود. فسفرآمید موستارد مسئول خواص ضد سرطانی سیکلوفسفامید است اما آکرولئین با تداخل در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بافت‌ها و تولید مقدار زیادی رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارای خواص موتاژنی است، به این ترتیب می‌تواند به راحتی با مولکول‌های دیگر از جمله آنزیم‌ها، گیرنده‌ها، پمپ‌های یونی ترکیب شده و باعث اکسیداسیون مستقیم و غیر فعال کردن یا مهار عملکرد عادی آن‌ها و در نتیجه راه‌اندازی فرآیند آپوپتوز شود [۱۳-۱۰].

بررسی‌های تجربی، اثرات دوگانه سیکلوفسفامید را در پاسخ ایمنی نشان داده‌اند. سیکلوفسفامید باعث ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی و جنینی موش، سلول‌های ریه و تیموس موش صحرایی می‌شود [۱۴،۱۵].

هر چند این دارو دارای خاصیت ضد سرطانی خوبی است و باعث کاهش حجم تومور می‌شود ولی دوز اضافه آن معمولاً باعث تضعیف در مکانیسم‌های دفاعی میزبان می‌شود که این ضعف معمولاً منجر به پاسخ‌های ایمونولوژی و اغلب باعث رشد عفونت‌های فرصت‌طلب و بعضی مواقع باعث بروز رشد دوباره سرطان می‌شود [۱۶،۱۷].

یکی از روش‌هایی که برای درمان یائسگی زودرس استفاده می‌شود جایگزینی هورمونی است [۱۸]. با توجه به این‌که یائسگی زودرس و یا قطع دائمی قاعدگی و باروری، به‌دلیل کاهش سطح استروژن و اختلال در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تخمدان می‌باشد، استروژن درمانی متداول‌ترین تجویز برای افزایش کیفیت زندگی در این افراد است. متاسفانه به‌دلیل خطرات قابل توجه این روش شامل خطر ابتلا به سرطان سینه، سرطان رحم و حوادث قلبی- عروقی، پزشکان در این مورد نیز ناگزیر به استفاده از درمان‌های جایگزین می‌باشند [۲۱-۱۹]. در سال‌های اخیر، توجه بسیاری به استفاده از مواد طبیعی

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

و داروهای گیاهی برای رفع این مشکلات شده است که می‌توانند دارای عوارض و خطرات کم‌تری باشند.

پروپولیس (بره موم) یک محصول طبیعی صمغی شکل از رزین‌های گیاهی است که از جوانه‌ها، برگ‌ها و دیگر بخش‌های گیاهانی مثل سپیدار، کاج، صنوبر و... ترشح شده و توسط زنبور عسل جمع‌آوری می‌گردد، سپس زنبورها به آن موم و دیگر ترشحات خود را اضافه می‌کنند. مطالعات بسیاری فعالیت‌های بیولوژیکی و دارویی شامل اثرات ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروپولیس را تایید کرده‌اند [۲۲،۲۳].

پروپولیس به‌عنوان یکی از قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی شناخته شده است به طوری که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی پروپولیس در واحدهای ORAC (روش ظرفیت جذب رادیکال اکسیژن) بیش از ۴ برابر ویتامین E می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که این اثرات عمدتاً به علت غلظت بالای پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها می‌باشد که از مهم‌ترین ترکیبات فعال دارویی و آنتی‌اکسیدانی در پروپولیس می‌باشند [۲۴].

از آن‌جایی‌که بسیاری از ناهنجاری‌های زمان بلوغ و بزرگسالی ناشی از استرس‌های مختلفی (در این مطالعه استرس دارویی) است که در دوران جنینی و نوزادی روی می‌دهند بنابراین دست یافتن به ترکیباتی که بتواند اثرات مخرب این استرس‌ها را بر اندام‌های بدن از جمله تخمدان‌ها مهار نمایند، اهمیت زیادی پیدا می‌کند. از طرفی با توجه به نقش تعیین‌کننده و حیاتی تخمدان در باروری و هم‌چنین خواص آنتی‌اکسیدانی قوی پروپولیس، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی پروپولیس بر مهار آسیب‌های تخمدانی موش صحرایی ناشی از شیمی‌درمانی با سیکلوفسفامید می‌باشد: یک ارزیابی هیستوپاتولوژیک، هورمونی و استرس اکسیداتیو.

مواد و روش‌ها

حیوانات و طراحی تحقیق. این پژوهش بر روی ۴۰ سر موش صحرایی ماده نژاد Wistar به وزن ۲۰۰-۱۸۰ گرم انجام شد. تمامی حیوانات تحت چرخه زمانی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای ۲۷-۲۳ درجه سانتی‌گراد در مرکز تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی سمنان نگه‌داری و آب و غذا بدون محدودیت در اختیار آن‌ها قرار داده شد. جهت تعیین روز صفر حاملگی، اسمیر واژینال رت‌ها به صورت روزانه با رنگ‌آمیزی کریستال ویولت بررسی شد. با توجه به این‌که بسیاری از رفتارهای غیر جنسی با جنسیت و حتی فازهای مختلف دوره جنسی ارتباط دارند لذا جهت انجام این مطالعه تنها موش‌هایی انتخاب شدند که دارای دو دوره متوالی سیکل استروس منظم بودند [۲۵]. سعی شد در تمام مراحل کار با حیوانات، دستورالعمل کمیته اخلاق و حمایت از حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه رعایت شود.

حیوانات به صورت تصادفی به ۵ گروه ۸ تایی به شرح ذیل گروه‌بندی شدند:

گروه ۱ (کنترل): فقط دریافت حلال پایه (حلال پروپولیس)

گروه ۲ (گروه شم یا سیکلوفسفامید): دریافت آب مقطر به‌صورت داخل صفاقی به مدت ۱۴ روز + دریافت سیکلوفسفامید یک بار با دوز ۲۰۰mg/kg در روز ۱۵ بارداری

گروه ۳: دریافت پروپولیس با دوز ۵۰mg/kg (۱۴ روز داخل صفاقی) + سیکلوفسفامید با دوز ۲۰۰mg/kg در روز ۱۵ بارداری

گروه ۴: دریافت پروپولیس با دوز ۱۰۰mg/kg (۱۴ روز داخل صفاقی) + سیکلوفسفامید با دوز ۲۰۰mg/kg در روز ۱۵ بارداری

گروه ۵: دریافت پروپولیس با دوز ۲۰۰mg/kg (۱۴ روز داخل صفاقی) + سیکلوفسفامید با دوز ۲۰۰mg/kg در روز ۱۵ بارداری

روش آماده‌سازی و تزریق پروپولیس. پروپولیس مورد استفاده در این تحقیق از کندوهای زنبور عسل واقع در نواحی شمالی استان سمنان جمع‌آوری و پس از تایید نهایی مرکز آموزشی علمی کاربردی جهاد کشاورزی استان سمنان و تا زمان عصاره‌گیری در داخل یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. جهت اثرپذیری بیش‌تر، عصاره‌ی هیدروالکلی پروپولیس هر هفته به صورت تازه تهیه گردید. به این ترتیب که ابتدا قطعات بزرگ بره موم به قطعات ریز خرد شده و سپس مقدار ۳۰ گرم از آن در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد در یک ظرف تیره رنگ در بسته و در دمای ۴۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت روی دستگاه هیتراستیرر قرار گرفت. سپس محلول حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره‌ی ۴۲، در دمای اتاق صاف گردید. عصاره‌ی آماده شده برای تهیه پودر خالص آن در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت قرار داده شد [۸،۹،۱۱،۲۶].

با استفاده از پودر خالص تهیه شده، در گروه‌های آزمایش، عصاره پروپولیس با دوز ۲۰۰mg/kg، ۱۰۰ و ۵۰ در الکل ۱۰ درصد تهیه و به صورت داخل صفاقی به حیوانات گروه‌های سوم، چهارم و پنجم به صورت روزانه و به مدت چهارده روز قبل از تزریق سیکلوفسفامید تزریق گردید [۲۶،۲۷].

۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق، حیوانات تحت بی‌هوشی کامل با دوز ۷۵ mg/kg کتامین قرار گرفته و سپس جهت سنجش میزان هورمون‌ها، خون‌گیری از ناحیه قلب حیوان انجام

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

و سپس نمونه‌برداری انجام شد. در هر بیوپسی وزن حیوان و تخمدان اندازه‌گیری و ثبت گردید. سپس تخمدان راست تمام حیوانات جهت ثابت‌سازی و انجام مطالعات هیستوپاتولوژیک به محلول بوئن منتقل شد و تخمدان چپ آن‌ها جهت سنجش فاکتورهای استرس اکسیداتیو MDA و TAC پس از تمیز نمودن در میکروتیوب قرار گرفته و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. نمونه سرم خون حیوانات نیز جهت سنجش میزان هورمون ۱۷بتا-استرادیول سرم در داخل لوله آزمایش جمع‌آوری شده و تا زمان سنجش آن در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید.

روش هیستوموفومتری انواع فولیکول‌های تخمدانی و ائوسیت. به منظور بررسی ریخت‌شناسی و شمارش تعداد انواع فولیکول‌های تخمدان و ائوسیت، پس از انجام خونگیری تخمدان‌ها از بدن حیوان خارج و وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد سپس تخمدان‌ها جهت بررسی‌های هیستومورفومتریک با استفاده از محلول بوئن ثابت شدند. در مرحله بعد، نمونه‌ها با استفاده از سالین شسته شدند و در دستگاه آماده‌سازی بافت (اتوتکنیکون) جهت پردازش بافتی قرار گرفتند. پس از قالب‌گیری با پارافین، برش‌های ۴ تا ۵ میکرومتری از تخمدان‌ها تهیه و با استفاده از روش هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند.

سپس ۵ برش متناوب از تخمدان هر گروه از حیوانات انتخاب شد و با میکروسکوپ نوری تعداد فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و فولیکول‌های آترتیک در هر ۵ اسلاید شمارش و قطر ائوسیت و فولیکول‌ها نیز اندازه‌گیری گردید [۳۰-۲۸].

انواع مختلف فولیکول‌ها بر اساس تقسیم‌بندی روش Pederson و Peters شناسایی و طبقه‌بندی شدند. به این ترتیب که فولیکول‌های بدوی از هر ۴ میدان دید و فولیکول‌های اولیه تک لایه از هر ۶ میدان دید در یک برش تخمدان شمارش گردیدند. ولی شمارش فولیکول‌های اولیه چند لایه، فولیکول‌های پری‌آنترال و آنترال به این ترتیب است که در هر برش تخمدان فولیکول‌هایی که فقط حاوی اووسیت با اندازه کامل می‌باشند مورد شمارش قرار گرفتند و به این ترتیب از شمارش تکراری فولیکول‌های نام‌برده در برش‌های دیگر جلوگیری گردید [۳۱،۳۲].

فولیکول‌های آترتیک نیز مطابق با روش مورفولوژیک شرح داده شده توسط Greenwald و Roy با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین و برش‌های سریال مورد شناسایی و شمارش قرار گرفتند [۳۳].

ارزیابی عملکرد تخمدان با سنجش میزان هورمون استرادیول (E2). برای اندازه‌گیری سطح سرمی هورمون ۱۷ بتا-استرادیول به این ترتیب عمل شد. بلافاصله پس از بی‌هوشی کامل حیوانات، خون‌گیری از ناحیه قلب آن‌ها انجام شده و پس از سانتریوفیوژ کردن با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه، سرم به دست آمده تا زمان اندازه‌گیری میزان هورمون در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت اندازه‌گیری میزان هورمون، از کیت الایزا با طول موج ۴۵۰nm استفاده شد (17-β Estradiol, ELISA, Bolden, England). حساسیت این کیت ۰/۳۹ نانوگرم در میلی‌لیتر می‌باشد [۳۴].

روش سنجش شاخص‌های استرس اکسیداتیو. شاخص‌های استرس اکسیداتیو از قبیل MDA و(FRAP) TAC در بافت تخمدان حیوانات طبق مراحل زیر اندازه‌گیری شدند: ۱- خارج کردن تخمدان حیوان و شست‌وشو در بافرسالین ۰/۹درصد سرد، ۲- قرار دادن بافت در ورق آلومنیومی و گذاشتن آن در فریزر دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد، ۳- هموژنیزه کردن بافت توسط دستگاه هموژینایزر و سونی کاتور، ۴- سانتریفیوژ کردن بافت با دور g×۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، ۵- جداکردن محلول رویی جهت سنجش مارکرهای استرس اکسیداتیو با روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از کیت‌های اختصاصی، ۶- سنجش TAC (ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی) بر اساس روش Benzie and Strain (۱۹۹۹) و تعیین MDA (غلظت مالون دی آلدئید) بر اساس روش Uchiyama and Makara انجام گردید [۳۵،۳۶].

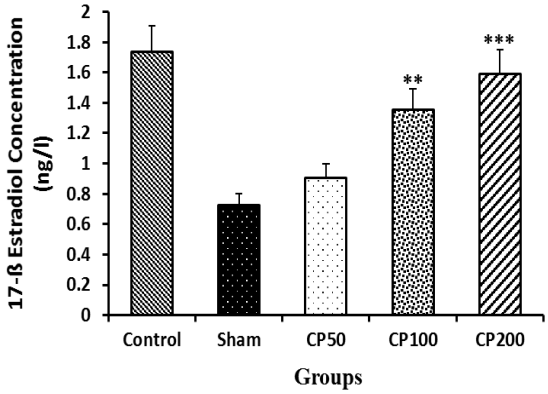
آنالیز آماری. اطلاعات هیستومورفومتری مربوط به هر نمونه شامل تعداد انواع فولیکول‌ها، قطر اووسیت و تعداد فولیکول‌های آترتیک توسط ویدئو میکروسکوپ (زایس آلمان) متصل به کامپیوتر مجهز به نرم‌افزار کامپیوتری آنالیز تصاویر بافتی (Motic Images China Group Co., LTD) مشخص و در جداول مربوطه ثبت گردید. هم‌چنین داده‌های مربوط به فاکتورهای استرس اکسیداتیو (TAC و MDA) و میزان هورمون ۱۷ بتا-استرادیول پس از استخراج توسط دستگاه الیزا در جداول مخصوص ثبت شدند. در نهایت پس از آزمون Smirnov -Kolmogorov، مشخص شد توزیع داده‌ها نرمال است و لذا از آنالیز واریانس یک طرفه Anova و آزمون تعقیبی توکی – کرامر استفاده گردید. داده‌ها به‌صورت Mean ± SD در جداول مربوطه ثبت و $P<۰/۰۵$ به‌عنوان سطح معنی‌داری داده‌ها در نظر گرفته شد.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

نتایج

اثر سیکلوفسفامید و عصاره پروپولیس بر سطح سرمی هورمون ۱۷-بتا استرادیول

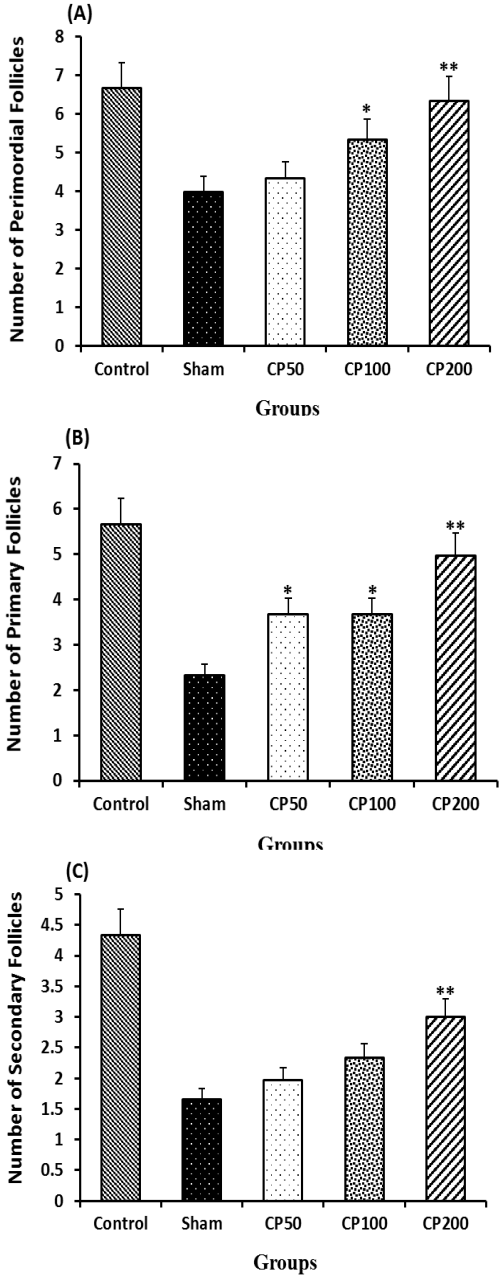
سیکلوفسفامید سطح هورمون ۱۷-بتا استرادیول در سرم خون حیوانات را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد و استفاده از عصاره پروپولیس با دوزهای مختلف به ویژه ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در گروه‌هایی که سیکلوفسفامید دریافت کرده بودند از این تغییرات به‌طور معنی‌داری جلوگیری نمود ($P<۰/۰۱$) (شکل ۱).



شکل ۱: اثر سیکلوفسفامید و پروپولیس بر سطح سرمی ۱۷ بتا استرادیول (ng/mL) در موش های صحرایی ماده که تحت تاثیر سیکلوفسفامید قرار داشتند. گروه کنترل (CO)، گروه سیکلوفسفامید (Sham)، گروه سیکلوفسفامید + ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره پروپولیس (CP50)، گروه سیکلوفسفامید + ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره پروپولیس (CP100) و گروه سیکلوفسفامید + ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره پروپولیس (CP200)، داده ها به صورت میانگین ± SEM ارائه شده است. ** P<0.01 و *** P<0.001 در مقایسه با گروه سیکلوفسفامید.

اثر سیکلوفسفامید و عصاره پروپولیس بر تعداد انواع فولیکول‌های تخمدانی

در حیواناتی که فقط سیکلوفسفامید دریافت کرده بودند میانگین تعداد فولیکول‌های بدوی، اولیه و ثانویه نسبت به گروه‌های کنترل و تحت درمان با عصاره پروپولیس به طور معنی‌داری کاهش یافته بود. در حیواناتی که سیکلوفسفامید و عصاره هیدروالکلی پروپولیس دریافت کرده بودند، مهار کاهش تعداد فولیکول‌های بدوی، اولیه و ثانویه تخمدانی مشاهده گردید که افزایش تعداد فولیکول‌های بدوی عمدتاً در گروه‌های تحت درمان با دوزهای ۱۰۰mg/kg و۲۰۰، افزایش تعداد فولیکول‌های اولیه در هر سه گروه تحت درمان و افزایش تعداد فولیکول‌های ثانویه فقط در گروه تحت درمان با دوز ۲۰۰mg/kg از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P<۰/۰۱$، $P<۰/۰۵$) (شکل ۲ و ۵).



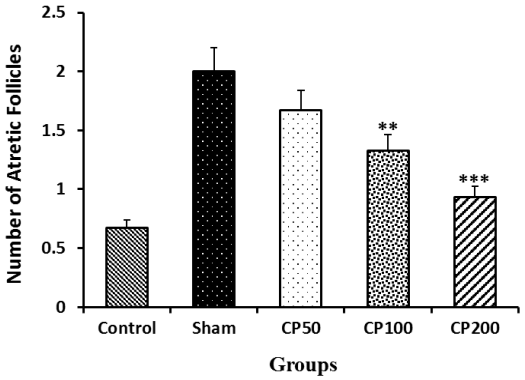
شکل ۲: اثر سیکلوفسفامید و پروپولیس بر تعداد فولیکولهای بدوی، اولیه و ثانویه تخمدان در موش های صحرایی ماده که تحت تاثیر سیکلوفسفامید قرار داشتند. گروه کنترل (CO)، گروه سیکلوفسفامید (Sham)، گروه سیکلوفسفامید + ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره پروپولیس (CP50)، گروه سیکلوفسفامید + ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره پروپولیس (CP100) و گروه سیکلوفسفامید + ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره پروپولیس (CP200)، داده ها به صورت میانگین ± SEM ارائه شده است. * P<0.05 و ** P<0.01 در مقایسه با گروه سیکلوفسفامید

اثر سیکلوفسفامید و عصاره پروپولیس بر تعداد فولیکول‌های آترتیک تخمدانی

در حیواناتی که فقط سیکلوفسفامید دریافت کرده بودند میانگین تعداد فولیکول‌های آترتیک تخمدان نسبت به گروه‌های کنترل و تحت درمان با عصاره پروپولیس به طور معنی‌داری

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

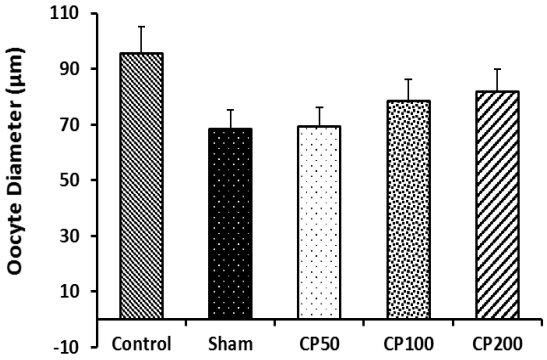
بیش‌تر بود. در حیواناتی که سیکلوفسفامید و عصاره هیدروالکلی پروپولیس دریافت کرده بودند، کاهش تعداد فولیکول‌های آترتیک مشاهده گردید که این کاهش عمدتاً در گروه‌های تحت درمان با دوزهای ۱۰۰mg/kg و ۲۰۰ از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P<۰/۰۱$، $P<۰/۰۰۱$) (شکل ۳ و ۵).



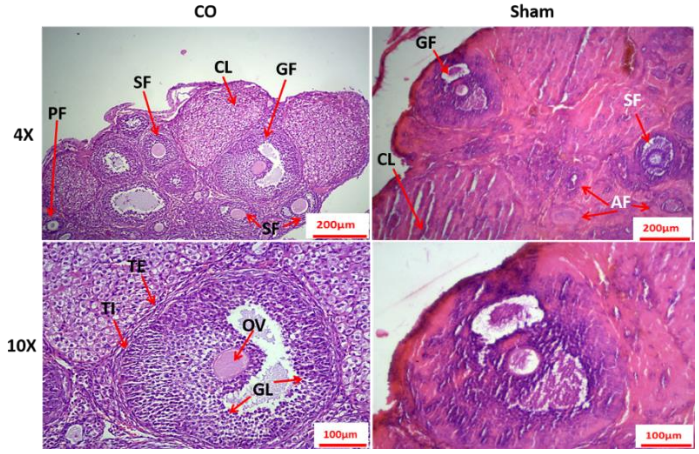
شکل ۳: اثر سیکلوفسفامید و پروپولیس بر تعداد فولیکول‌های آترتیک تخمدان در موش های صحرایی ماده که تحت تاثیر سیکلوفسفامید قرار داشتند. گروه کنترل (CO)، گروه سیکلوفسفامید (Sham)، گروه سیکلوفسفامید + ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره پروپولیس (CP50)، گروه سیکلوفسفامید + ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره پروپولیس (CP100) و گروه سیکلوفسفامید + ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره پروپولیس (CP200)، داده ها به صورت میانگین ± SEM ارائه شده است. ** $P<0.01$ و *** $P<0.001$ در مقایسه با گروه سیکلوفسفامید.

اثر سیکلوفسفامید و عصاره پروپولیس بر قطر ائوسیت

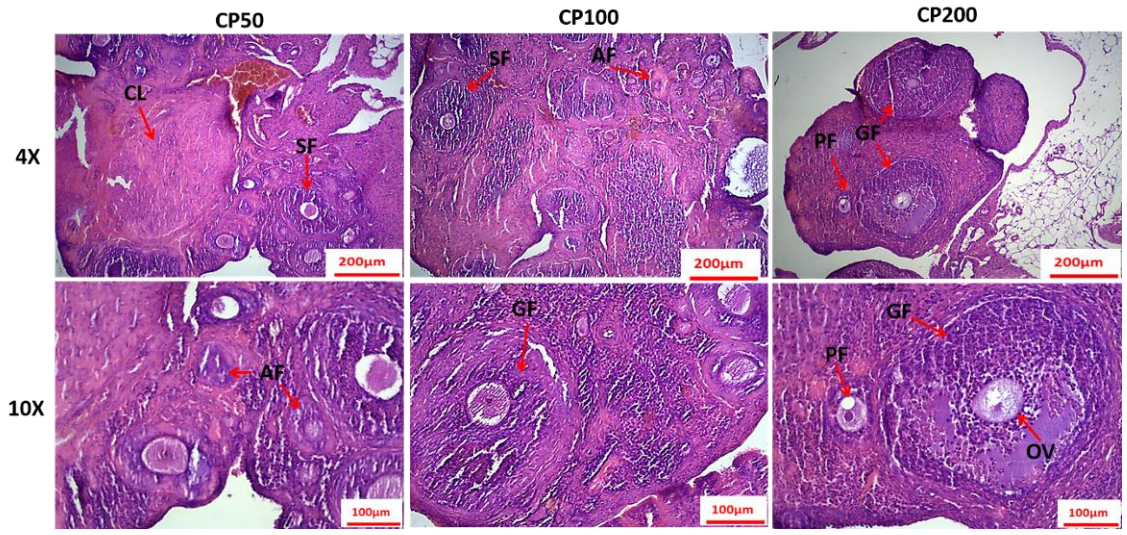
در حیواناتی که فقط سیکلوفسفامید دریافت کرده بودند میانگین قطر ائوسیت نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کم‌تر بود. در حیواناتی که سیکلوفسفامید و عصاره هیدروالکلی پروپولیس دریافت کرده بودند، افزایش قطر ائوسیت مشاهده گردید ولی این افزایش در هیچ‌یک از گروه‌های تحت درمان از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (شکل ۴ و ۵).



شکل ۴: اثر سیکلوفسفامید و پروپولیس بر قطر ائوسیت تخمدان در موش های صحرایی ماده که تحت تاثیر سیکلوفسفامید قرار داشتند. گروه کنترل (CO)، گروه سیکلوفسفامید (Sham)، گروه سیکلوفسفامید + ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره پروپولیس (CP50)، گروه سیکلوفسفامید + ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره پروپولیس (CP100) و گروه سیکلوفسفامید + ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره پروپولیس (CP200)، داده ها به صورت میانگین ± SEM ارائه شده است.



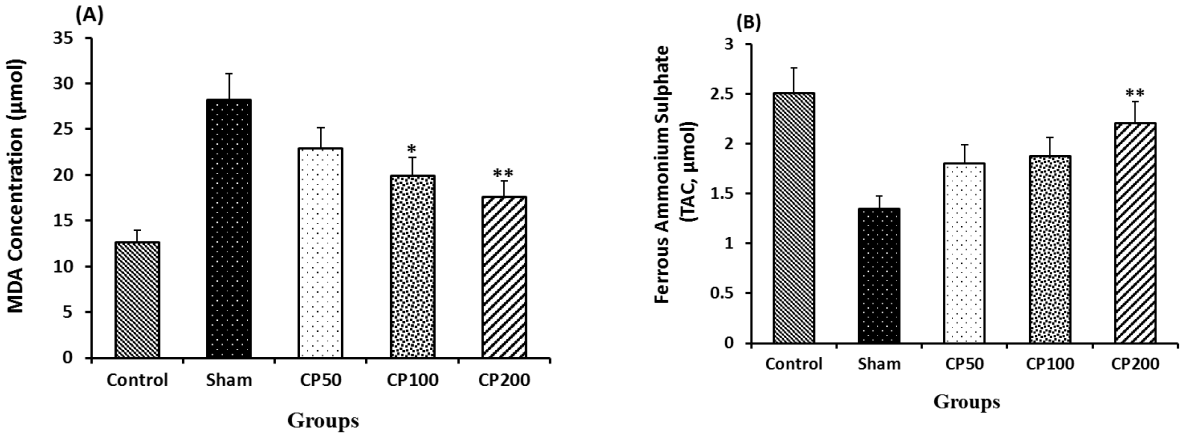
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]



شکل۵. تصویر میکروسکوپ نوری مقطع تخمدان موش های صحرایی ماده در گروههای کنترل (CO)، سیکلوفسفامید (Sham)، سیکلوفسفامید + ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره پروپولیس (CP50)، سیکلوفسفامید + ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره پروپولیس (CP100) و سیکلوفسفامید + ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره پروپولیس (CP200). انواعی از فولیکولهای تخمدانی در مقطع تخمدان تمامی گروهها قابل مشاهده می باشند. بهم ریختگی و بی نظمی در ساختار تخمدان (فولیکولها و استروما) و افزایش فولیکولهای آترتیک در گروه سیکلوفسفامید نسبت به گروههای دیگر و بهبود ساختار تخمدان و کاهش فولیکولهای آترتیک در گروههایی که پروپولیس دریافت نموده اند نسبت به گروه سیکلوفسفامید کاملاً مشهود است. (PF) فولیکول اولیه، (SF) فولیکول ثانویه، (GF) فولیکول گراف، (AF) فولیکول آترتیک، (CL) جسم زرد، (OV) اووم، (GL) لایه سلولهای گرانولوزا، (TI) لایه تکای داخلی (TE) لایه تکای خارجی. بزرگنمایی ×۴۰ و ×۱۰۰، رنگ آمیزی H&E.

اثر سیکلوفسفامید و عصاره پروپولیس بر سطح مالون دی آلدئید (MDA) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل تخمدان (TAC)

حیواناتی که فقط سیکلوفسفامید دریافت کرده بودند میانگین میزان MDA و TAC تخمدان آن‌ها نسبت به گروه‌های کنترل و تحت درمان با عصاره پروپولیس به طور معنی‌داری به ترتیب بیش‌تر و کم‌تر بود. در حیواناتی که سیکلوفسفامید و عصاره هیدروالکلی پروپولیس دریافت کرده بودند، کاهش معنی‌دار سطح MDA در گروه‌های تحت درمان با دوزهای ۱۰۰mg/kg و ۲۰۰ و افزایش معنی‌دار سطح TAC در گروه تحت درمان با دوز ۲۰۰mg/kg مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$، $P<۰/۰۱$) (شکل ۶).



شکل ۶. اثر سیکلوفسفامید و عصاره پروپولیس بر سطح مالون دی آلدئید (MDA) و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل تخمدان (TAC) در موش های صحرایی ماده که تحت تاثیر سیکلوفسفامید قرار داشتند. گروه کنترل (CO)، گروه سیکلوفسفامید (Sham)، گروه سیکلوفسفامید + ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره پروپولیس (CP50)، گروه سیکلوفسفامید + ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره پروپولیس (CP100) و گروه سیکلوفسفامید + ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره پروپولیس (CP200)، داده ها به صورت میانگین ± SEM ارائه شده است. * $P<0.05$ و ** $P<0.01$ در مقایسه با گروه سیکلوفسفامید.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

بحث و نتیجه‌گیری

درمان سرطان با داروهای شیمی‌درمانی از جمله سیکلوفسفامید ممکن است تعداد فولیکول‌ها و ائوسیت تخمدان را کاهش دهد یا باعث اختلال در تعادل هورمونی زنانه گردد. چنین نتیجه‌ای در مورد دختران و زنان جوانی که شیمی‌درمانی می‌شوند بسیار ناامیدکننده است [۳۷].

در این مطالعه احتمالاً برای اولین بار مشخص شد که تزریق عصاره‌ی هیدروالکلی پروپولیس باعث مهار کاهش جمعیت فولیکولی (بدوی، اولیه و ثانویه) و قطر ائوسیت در بافت تخمدان در مدل شیمی‌درمانی می‌شود. هم‌چنین استفاده از این عصاره باعث کاهش تعداد فولیکول‌های آترتیک تخمدان، افزایش میزان هورمون ۱۷ بتا–استرادیول و افزایش سطح ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی (TAC) و کاهش MDA سطح سرم خون در مدل شیمی‌درمانی با سیکلوفسفامید می‌شود.

مطالعات نشان داده‌اند که آپوپتوز سلول‌های گرانولوزای تخمدانی باعث کاهش بیوسنتز ۱۷–بتا استرادیول و ایجاد شرایط هیپواستروژنی در تخمدان می‌شود [۳۶]. کاهش سطح ۱۷–بتا استرادیول از طریق القای آپوپتوز باعث کاهش کیفیت تخمک می‌شود. فرضیه ما این است که سیکلوفسفامید باعث القای آپوپتوز در سلول‌های گرانولوزا می‌شود و ممکن است بیوسنتز ۱۷–بتا استرادیول را کاهش دهد، بنابراین سیکلوفسفامید با افزایش حساسیت تخمدان به آپوپتوز، کیفیت تخمک را کاهش می‌دهد. به نظر می‌رسد کاهش جمعیت فولیکول‌های تخمدانی و افزایش فولیکول‌های آترتیک احتمالاً ناشی از اختلال در ترشح گنادوتروپین‌ها و استروئیدها (۱۷–بتا استرادیول) به دنبال استرس اکسیداتیو ناشی از مصرف سیکلوفسفامید باشد.

در مطالعه‌ی حاضر احتمالاً پروپولیس به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی (قدرت آنتی‌اکسیدانی آن چهار برابر ویتامین E) قادر است از تخریب و آترزی فولیکولی جلوگیری نموده و در نهایت از کاهش تعداد فولیکول‌های تخمدان نیز محافظت نماید. یافته‌های قبلی نشان داده‌اند، زمانی که ویتامین E و C به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در درمان حیوانات تیمار شده با متی‌داتیون (یک ماده‌ی عامل پراکسیداسیون لیپیدی در تخمدان و عامل افزایش فولیکول‌های آترتیک) استفاده می‌شود، به طور معنی‌داری باعث کاهش تعداد فولیکول‌های آترتیک می‌شوند [۸].

فولیانگ و همکاران، در مطالعه خود بر روی موش‌های دیابتی مشاهده نمودند که عصاره پروپولیس باعث کاهش قند خون این موش‌ها گشته و هم‌چنین باعث سرکوب عوامل اکسیدان و کاهش استرس اکسیداتیو می‌گردد [۳۹].

ثقفی و همکاران، اثر ضد توموری پروپولیس را در بررسی‌های آزمایشگاهی بر روی سرطان پستان روی موش‌های ماده مشاهده کردند و نتیجه گرفتند که به دلیل نقش آپوپتوز در سیکل سلولی و آنژیوژنز می‌توان آن را به عنوان ماده درمانی جدید به تنهایی یا همراه با داروهای استاندارد شیمی‌درمانی پیشنهاد کرد [۴۰].

در چندین مطالعه‌ی آزمایشگاهی و حیوانی دیگر نیز پروپولیس در همراهی با شیمی‌درمانی، اثر کمکی داشته و باعث کاهش عوارض و سمیت آن شده است.

در بررسی‌های آزمایشگاهی و بررسی‌هایی که بر روی گرافت‌های سرطان پستان روی موش‌های ماده انجام دادند به این نتیجه رسیدند که پروپولیس، رشد سلول‌های سرطان پستان انسان را همراه با کاهش توکسیسیته روی سلول‌های نرمال مهار می‌کند [۱۰].

شواهد زیادی حاکی از آن است که سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال گونه اکسیژنی فعال (Species, ROS Reactive Oxygen) بیش‌تری تولید می‌کنند و در معرض استرس اکسیداتیو قرار دارند [۷]. ازجمله این شواهد می‌توان به افزایش محصولات حاصل از واکنش‌های با واسطه ROS و ردیابی آن‌ها در خون و ادرار و افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در پاسخ به استرس اکسیداتیو اشاره نمود [۸]. در سلول‌های سرطانی افزایش میزان ROS نتیجه افزایش فعالیت متابولیک، نقص عملکرد میتوکندری، فعالیت پراکسیزوم‌ها، افزایش سیگنالینگ‌های با واسطه‌ی رسپتور، فعال شدن آنکوژن‌ها، افزایش فعالیت اکسیدازها، سیکلواکسیژنازها، لیپواکسیژنازها و تیمیدین فسفریلاز می‌باشد [۸].

گونه‌های اکسیژنی فعال (ROS) ممکن است نقش مهمی در بقاء و تکامل فولیکول‌های تخمدانی داشته باشند به طوری‌که افزایش آن‌ها باعث کاهش سریع و شدید فولیکول‌های بدوی در تخمدان می‌شود. ROS هم‌چنین ممکن است یک نقش مهم در شروع فرآیند آپوپتوز وآترزی فولیکول‌ها داشته باشد. هم‌چنین کاهش میزان گلوتاتیون (به عنوان یک آنتی‌اکسیدان سلولی) باعث تحریک آترزی فولیکولی می‌شود [۴۱]. استفاده از عصاره‌ی پروپولیس ایرانی در این مطالعه به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی احتمالاً از طریق افزایش تولید استروئیدهای تخمدانی باعث کاهش تولید ROS و به دنبال آن کاهش آپوپتوز سلول‌های گرانولوزا و آترزی فولیکولی شده است [۸،۹].

پروپولیس حاوی مقادیر زیادی مواد آنتی‌اکسیدان به همراه صمغ و رزین و مواد تشکیل‌دهنده آن می‌باشد که توسط زنبور عسل به عنوان سیستم ایمنی کندو ساخته و در منافذ ورودی

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

کندو جاسازی می‌شود. این ماده دارای اثرات ضدباکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی، ضد سرطانی و همچنین یک آنتی‌اکسیدان قوی می‌باشد که در گزارشات مختلف به آن اشاره شده است. همچنین در جنگ‌های روسیه در دهه ۱۹۰۰ در درمان زخم‌های مجروحین بسیار مورد استفاده قرار گرفت به‌طوری‌که پس از آن این ماده را به عنوان پنی‌سیلین روسی می‌شناختند [۴۲].

طالبی و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که سطح سرمی هورمون آنتی‌مولرین و تعداد فولیکول‌های تخمدانی در مدل شیمی‌درمانی با سیکلوفسفامید کاهش پیدا می‌کند که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌راستا می‌باشد [۴۳].

در مورد اثر ترکیبات پروپولیس بر سلول‌های سرطانی اثر مفید درمانی آن بر روی برخی سرطان‌ها از جمله سرطان پستان و تاثیر آن همراه با شیمی‌درمانی مطالعاتی انجام شده که اغلب بر روی موش یا به صورت آزمایشگاهی بوده است [۴۴].

پشنهاد شده است که وجود مقادیر زیادی از فلانوئیدها، اسیدهای آروماتیک و ترکیبات فنلی در پروپولیس، مسئول اکثر فعالیت‌های زیستی و دارویی پروپولیس می‌باشد. همچنین مطالعات نشان داده است که پروپولیس برای انسان و پستانداران سمی نیست مگر آن‌که در مقادیر بسیار زیاد مصرف شود [۴۵].

ترکیبات مؤثره عصاره آبی–الکلی پروپولیس در مطالعات قبلی شناسایی شده و نشان داده شده است که این عصاره یکی از غنی‌ترین منابع فنل‌های گیاهی شامل؛ فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک است که به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی شناخته می‌شوند [۴۸–۴۶]. این ترکیبات قادر به جذب رادیکال‌های آزاد و محافظت از لیپیدها و سایر ترکیبات مانند ویتامین C در برابر اکسیداسیون یا تخریب در طی استرس اکسیداتیو هستند [۲۳].

علاوه بر فلاونوئیدها، پروپولیس حاوی ترکیبی به نام فنتیل استر کافئیک اسید (CAPE) می‌باشد که مسئول خواص آنتی‌اکسیدانی آن است و از غشای سلولی در برابر پراکسیداسیون لیپیدی محافظت می‌کند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که CAPE با سرکوب تولید رادیکال آزاد اکسیژن به عنوان یک آنتی‌اکسیدان، سطح مالون دی آلدئید (MDA) را کاهش می‌دهد [۴۹].

این عصاره همچنین دارای اثرات متفاوتی از جمله اثرات ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ... می‌باشد که در مطالعات مختلف اثبات شده‌اند، این مطالعات نشان داده‌اند که این اثرات عمدتاً مربوط به بخش پلی‌فنلی این عصاره می‌باشد [۵۰،۵۱].

گزارش شده است که بعد از درمان با پروپولیس، فعالیت آنزیمی و غیر آنزیمی آنتی‌اکسیدان‌ها و سطح ویتامین C در پلاسما، کلیه، معده، روده کوچک و روده بزرگ به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. ثابت شده است که پروپولیس از گردش خون جذب شده و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان آب‌دوست برای جذب ویتامین C نقش دارد [۵۲].

در مطالعه حاضر نیز به نظر می‌رسد نقش حفاظتی پروپولیس در جلوگیری از اختلالات ساختاری و عملکردی تخمدان در مدل شیمی‌درمانی با سیکلوفسفامید، به‌طور عمده ناشی از اثرات ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانی ترکیبات موثره آن به‌ویژه فلاونوئیدها و پلی‌فنول‌های آن می‌باشد. در واقع نتایج به‌دست آمده در مطالعه ما نیز تا حدود زیادی در راستای تحقیقات فوق‌الذکر می‌باشد.

این بررسی نشان می‌دهد که اثرات آنتی‌اکسیدانتی پروپولیس موجب مهار کاهش فولیکول‌های تخمدانی، کاهش فولیکول‌های آترتیک و مهار کاهش استرادیول تخمدانی در رت‌های دریافت‌کننده سیکلوفسفامید می‌شود که به احتمال زیاد به دلیل وجود ترکیباتی مانند فلاونوئیدها و پلی‌فنول‌ها می‌باشد. بنابراین پروپولیس با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی بسیار قوی، احتمالاً می‌تواند به عنوان ترکیبی با پتانسیل محافظتی و درمانی در برابر آسیب‌های ناشی از شیمی‌درمانی در بهبود عملکرد و ساختار تخمدان آسیب‌دیده پس از شیمی‌درمانی مد نظر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از طرحی است که بر اساس تفاهم‌نامه فی مابین دانشگاه علوم پزشکی سمنان و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران انجام شده است و مربوط به بخشی از پایان‌نامه خانم عاطفه عرب‌عامری دانشجوی دکتری فیزیولوژی جانوری می‌باشد. بدین‌وسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی سمنان و معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران که امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند کمال تشکر و قدردانی را دارد.

محدودیت‌های طرح

محدودیت‌هایی که در این تحقیق با آن مواجه بودیم شامل؛ تامین منابع مالی مورد نیاز و گرانی بیش از حد آنتی‌بادی‌ها و کیت‌های مورد نیاز جهت انجام آزمایشات بود.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

مشارکت و نقش نویسندگان

نقش هر یک از نویسندگان این مقاله به شرح زیر می‌باشد: حمیدرضا ثامنی، عاطفه عرب عامری و شهربانو عریان: ارائه ایده و طراحی مطالعه، عاطفه عرب عامری: انجام آزمایش‌ها و جمع آوری داده‌ها، شهربانو عریان، حمیدرضا ثامنی و احمدرضا بندگی: آنالیز و تفسیر نتایج و نوشتن نسخه اولیه مقاله، همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تایید نمودند.

منابع

[1] Noori-Daloii MR, Rashvand Z. Molecular genetics and gene therapy in ovarian cancer. Intern Med Today 2010; 16: 5-19.

[2] Priya K, Setty M, Babu UV, Ranganath Pai KS. Implications of environmental toxicants on ovarian follicles: how it can adversely affect the female fertility? Environ Sci Poll Res 2021; 28: 67925-67939. https://doi.org/10.1007/s11356-021-16489-4 PMid:34628616 PMCid:PMC8718383

[3] Rai J, Pandey SN, Srivastava RK. Effect of immobilization stress on spermatogenesis of albino rats. J Anat Soc India 2003; 52: 55-57.

[4] Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics, 2005. CA Cancer J Clin 2005; 55: 10-30. https://doi.org/10.3322/canjclin.55.1.10 PMid:15661684

[5] Bhat Manjula S, Yajurvedi HN. Stress induced alterations in pre-pubertal ovarian follicular development in rat. J Stress Physiol Biochem 2011; 7: 51-68.

[6] Oheb Y, Asadi M, Sarhangi N, Mohamad Amoli M. Investigation of genetic factors associated with polycystic ovary syndrome. Koomesh 2022; 24: 176-182. (Persian).

[7] Abdullah KH. Effect of stress hormone antagonists on ovarian follicular development in pre-pubertal rat. J Stress Physiol Biochem 2012; 8: 82-98.184.

[8] Arabameri A, Sameni HR, Bandegi AR. Protective effect of hydro-alcoholic extract of Iranian proposes on the structure of neonatal rat ovary following stress. Koomesh 2015; 17: 509-517. (Persian).

[9] Arabameri A, Sameni HR, Bandegi AR. The effects of proposes extract on ovarian tissue and oxidative stress in rats with maternal separation stress. Int J Reproduct BioMed 2017; 15: 509-520. https://doi.org/10.29252/ijrm.15.8.509 PMid:29082370

[10] Nazari F, Johari H, Hemayatkhah Jahromi V, Samanei jahromi E, Kargar H. Effect of hydro-alcoholic extract of ginseng on cyclophosphamide detoxification in ovary tissue of female adult rats. Pars J Med Sci 2014; 12: 23-30. https://doi.org/10.29252/jmj.12.3.23

[11] Sameni HR, Seiri M, Safari M, Tabrizi Amjad MH, Khanmohammadi N. Bone marrow stromal cells with the granulocyte colony-stimulating factor in the management of chemotherapy-induced ovarian failure in a rat model. Iran J Med Sci 2019; 44: 135-142.

[12] Senthilkumar S, Yogeeta SK, Subashini R, Devaki T. Attenuationn of cyclosphamide induced toxicity by squalene in experimental rats. Chem Biol Interact 2006; 160: 252-260. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.02.004 PMid:16554041

[13] Lee HJ, Selesniemi K, Niikura Y, Niikura T, Klein R, Dombkowski DM, Tilly JL. Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. J Clin Oncol 2007; 25: 3198-3204. https://doi.org/10.1200/JCO.2006.10.3028 PMid:17664466

[14] Persson I, Weiderpass E, Bergkvist L, Bergstrom R, Schairer C. Risks of breast and endometrial cancer after estrogen and estrogen-progestin replacement. Cancer Causes Control 1999; 10: 253-260. https://doi.org/10.1023/A:1008909128110 PMid:10482483

[15] Ross RK, Paganini-Hill A, Wan PC, Pike MC. Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. J Natl Cancer Inst 2000; 92: 328-332. https://doi.org/10.1093/jnci/92.13.1100a https://doi.org/10.1093/jnci/92.4.328 PMid:10675382

[16] Oraby HA, Hassan AA, Aboul Maaty NA. Effect of cyclophosphamide on transcription of SOD1 mRNA and GPX1 mRNA in mice liver and brain tissues. J Appl Baosc 2010; 29: 1736-1742.

[17] Khaksary Mahabady M, Najafzaded Varzi H, Bakhtiari E. The effects of cyclophosphamide, melatonin and carvedilol on neural tube and skeletal system of mice fetuses in prenatal period. Ann Anat 2011; 193: 459-465. https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.05.003 PMid:21664112

[18] Leal O, Leal EA, Borges Junior FR, Paez ML, Teodosio S Tavares - Neto J. Clinical - parasitological response to treatment with quinine associated to doxycy cline in uncomplicated falciparum malaria. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36: 751-754. https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000600019 PMid:15049119

[19] Asiri YA. Probucol attenuates cyclophosphamide-induced oxidative apoptosis, p53 and bax signal expression in rat cardiac tissues. Oxid Med Cell Longev 2010; 3: 308-316. https://doi.org/10.4161/oxim.3.5.13107 PMid:21150336 PMCid:PMC3154034

[20] Wang GJ, and Cai L. Relatively Low -dose cyclophosphamid is likely to induce apoptosis cell death in rat thymus through Fas/Fas ligand pasthway. Mutat Res 1999; 427: 125-133. https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00089-5 PMid:10393266

[21] Diasio RB, LoBuglio AF. Immunomodulators: immunosuppressive agents and immunostimulants the pharmacological basis of therapeutics. 9th Edition, Mcgraw Hill London 1996; 1291-1308.

[22] Matar P, Rozados VR, G.nzalez AB, Dlugovitzky DG, Bonfil RD, Scharovsky OG. Mechanism of antimetastatic immunopotemtiation by low dose cyclophosphamid. Eur J Cancer (part A) 2000; 36: 1060-1066. https://doi.org/10.1016/S0959-8049(00)00044-7

[23] Bogdanov S. Functional and biological properties of the Bee products. Bee Product Sci 2011; 1-12.

[24] Taherian AA, Sameni HR, Sharifi S, Taherian MM, Taherian MH. Effects of hydroalchoholic extract of Iranian Propolis on acute, chronic and visceral pain in mice. Koomesh 2020; 22: 170-177. (Persian). https://doi.org/10.29252/koomesh.22.1.170

[25] Faramarzi A, Seifi B, Sadeghipour HR, Shabanzadeh A, Sohani M, Ebrahimpoor M. Effects of bilateral tubal sterilization on serum oxidative stress and ovarian hormones in female rats. Hormozgan Med J 2011; 6: 437-444. (Persian).

[26] Ghassemi L, Zabihi M, Mahdavi R, Seyedmajidi M, Akram S, Motallebnejad M. The effect of ethanolic extract of proposes on radiation-induced mucositis in rats. Saudi Med J 2010; 31: 622-626.

[27] Lahouel M, Boutabet K, Kebsa W, Alyane M. Polyphenolic fractions of Algerian proposes reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress. Afr J Pharm Pharmacol 2010; 4: 712-720.

[28] Takehara Y, Yabuuchi A, Ezoe K, Kuroda T, Yamadera R, Sano C, et al. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. Lab Invest 2013; 93: 181-193.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[40] Saghafi N, Yousofi Z, Homai Shandiz F, Afzal Aghaee M, Javada Mehr M. Comparison of efficacy and side effects of proposes with chemotherapy and chemotherapy alone for neoadjuant therapy of ovarian cancer. Iran J Obstet Gynecol Infer 2015; 18: 1-5.
[41] Devine PJ, Perreault SD, Luderer U. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. Biol Reprod 2012; 86: 1-10.
https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095224
PMid:22034525 PMCid:PMC3290661
[42] Afrouzan H, Bankova V, Tahmasebi GH. Comparison of Gymnosperms and Angiosperms plants on quality and antibacterial activity of proposes. Pharmacogn Magazine 2007; 3: 156-163.
[43] Talebi A, Hayati Roodbari N, Sameni HR, Zarbakhsh S. Impact of coadministration of apigenin and bone marrow stromal cells on damaged ovaries due to chemotherapy in rat: An experimental study. Int J Reprod BioMed 2020; 18: 551-560.
https://doi.org/10.18502/ijrm.v13i7.7372
PMid:32803119 PMCid:PMC7385912
[44] Popova M, Silici S, Kaftanoglu O. Antibacterial activity of Turkish proposes and its qualitive and quantitive chemical composition. Phytomedicin J 2005; 12: 221-228.
https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.09.007
PMid:15830845
[45] Mohammadzadeh S, Shariatpanahi M, Hamedi M, Ahmadkhaniha R, Samadi N, Ostad SN. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian proposes. Food Chem 2007; 103: 1097-1103.
https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.006
[46] Arul Selvan K, Prabhu T. Extraction of Propolis from beehives and characterization of its constituents and medicinal properties. Int J Adv Eng Technol 2010; 11: 50-53.
[47] Jasprica I, Bojic M, Mornar A, Besic E, Bucan K, Medic-Saric M. Evaluation of antioxidative activity of croatian propolis samples using DPPH· and ABTS·+ Stable free radical assays. Molecules 2007; 12: 1006-1021.
https://doi.org/10.3390/12051006
PMid:17873836 PMCid:PMC6149354
[48] Miguel M, Nunes S, Dandlen S, Cavaco A, Antunes M. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of proposes from Algarve, South of Portugal. Food Chem Toxicol 2010; 48: 3418-3423.
https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.09.014
PMid:20849908
[49] El-Masry T, Emara A, El-Shitany N. Possible protective effect of proposes against lead induced neurotoxicity in animal model. J Evol Biol Res 2011; 3: 4-11.
[50] Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? J Ethnopharmacol 2011; 133: 253-260.
https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.032
PMid:20970490
[51] Falcão SI, Tomás A, Vale N, Gomes P, Freire C, Vilas-Boas M. Phenolic quantification and Botanical origin of Portuguese proposes. Ind Crop Prod 2013; 49: 805-812.
https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.021
[52] Seven I, Aksu T, Seven P. The effects of propolis on biochemical parameters and activity of antioxidant enzymes in broilers exposed to lead-induced oxidative stress. Asian Austr J Anim Sci 2010; 23: 1482-1489.
https://doi.org/10.5713/ajas.2010.10009
https://doi.org/10.1038/labinvest.2012.167
PMid:23212100 PMCid:PMC3561594
[29] Fu X, He Y, Xie C, Liu W. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage. Cytotherapy 2008; 10: 353-363.
https://doi.org/10.1080/14653240802035926
PMid:18574768
[30] Devine PJ, Sipes IG, Hoyer PB. Initiation of delayed ototoxicity by in vitro and in vivo exposures of rat ovaries to 4-vinylcyclohexene dioxide. Reprod Toxicol 2004; 19: 71-77.
https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.06.002
PMid:15336714
[31] Peters H. The Development of the mouse ovary from birth to maturity. Acta Endocrinol 1969; 62: 98-116.
https://doi.org/10.1530/acta.0.0620098
PMid:5394354
[32] Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. J Report Fertile 1968; 17: 555-557.
https://doi.org/10.1530/jrf.0.0170555
PMid:5715685
[33] Lunenfeld B, Insler V. Follicular development and its control. Gynecol Endocrinol 1993; 7: 285-291.
https://doi.org/10.3109/09513599309152514
PMid:8147239
[34] Liu T, Qin W, Huang Y, Zhao Y, Wang J. Induction of estrogen-sensitive epithelial cells derived from human-induced pluripotent stem cells to repair ovarian function in a chemotherapy-induced mouse model of premature ovarian failure. DNA Cell Biol 2013; 32: 685-698.
https://doi.org/10.1089/dna.2013.2032
PMid:24032550 PMCid:PMC3864371
[35] Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol 1999; 299: 15-27.
https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5
PMid:9916193
[36] Uchiyama M, Makara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal Biochem 1978; 86: 271-278.
https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1
PMid:655387
[37] Wang F, Wang L, Yao X, Lai D, Guo L. Human amniotic epithelial cells can differentiate into granulosa cells and restore folliculogenesis in a mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. Stem Cell Res Ther 2013; 4: 1-11.
https://doi.org/10.1186/scrt335
PMid:24406076 PMCid:PMC3854701
[38] Guigon CJ, Mazaud S, Forest MG, Brailly Tabard S, Coudouel N, Marge S. Unaltered development of the initial follicular waves and normal pubertal onset in female rats after neonatal deletion of the follicular waves. Endocrinology 2003; 144: 3651-3662.
https://doi.org/10.1210/en.2003-0072
PMid:12865348
[39] Fuliang HU, Hepburn HR, Xuan H, Chen M, Daya S, Radloff SE. Effects of proposes on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. Pharmacol Res 2005; 51: 147-152.
https://doi.org/10.1016/j.phrs.2004.06.011
PMid:15629260

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

Koomesh -Volume 25, Issue 3 (May and June 2023), 318-328

The effects of the proposed hydro alcoholic extract on inhibition of ovarian changes caused by chemotherapy with cyclophosphamide in rats

Atefeh Arabameri (M.Sc)[1], Shahrbano Oryan (Ph.D)[*1], Hamidreza Sameni (Ph.D)[*2,3], Ahmadreza Bandegi (Ph.D)[3]
1- Dept. of Animal Physiology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Unit, Tehran Azad University, Tehran, Iran
2 - Nervous System Stem Cells Research Center and Dept. of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
3 - Dept. of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
4- Research Center of Physiology and Dept. of Biochemistry, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

* Corresponding author. +98 23-33654218 sh_oryan@yahoo.com-hrsameni@gmail.com Received: 21 Jan 2023; Accepted: 24 May 2023

Introduction: One of the most destructive side effects of chemotherapy is damage to the reproductive system. Cyclophosphamide (CTX), as one of the most widely used chemotherapy drugs, has toxic and irreversible effects on the ovary. This study aims to investigate the effects of hydroalcoholic extract of proposes on improving the structure and function of rat ovaries damaged by chemotherapy with cyclophosphamide.

Materials and Methods: This research was conducted on 40 female Westar rats (5 groups of 8), including the sham group; receiving only the basic solvent (proposed solvent), the control group; receiving distilled water intraperitoneal for 14 days and cyclophosphamide once with a dose of 200 mg/kg on the 15th day of pregnancy, groups 3, 4 and 5 including mice that received proposes with a dose of 200, 100 and 50 mg/kg respectively (14 days, intraperitoneal) and cyclophosphamide once at a dose of 200 mg/kg on the 15th day of pregnancy. 24 hours after the last injection, blood was taken to measure the level of serum 17-beta-estradiol hormone. Then, the right ovaries of all animals were fixed in Bouin's solution for histopathological studies, and tissue sections were prepared and stained. After freezing, their left ovary was homogenized and centrifuged, and its supernatant was used to measure the oxidative stress factors TAC and MDA according to the method mentioned in the relevant kits.

Results: The use of the proposed hydro alcoholic extract with doses of 50, 100, and 200 mg/kg inhibits the decrease in the number of ovarian follicles and oocyte diameter, decreases the number of athreptic follicles, increases the amount of 17-beta-estradiol hormone, and increases the level of total antioxidant factor (TAC) and reducing the level of malondialdehyde (MDA) in the chemotherapy model.

Conclusion: This study showed that the hydro-alcoholic extract of proposes significantly prevents the destructive effects of cyclophosphamide on the structure and function of the ovary.

Keywords: Propolis, Ovary, Ovarian Follicle ،Cyclophosphamide, Oxidative stress

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]