Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 23:02 +0330 on Tuesday November 20th 2018

مقاله پژوهشی

ارزیابی تأثیر محافظتی اتیل پیروات بر روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی (IVF) در موش‌های سوری درمان شده با سیکلوفسفامید

فهیمه خان‌محمدی‌قانع[1]*، عباس احمدی[2]، رسول شهروز[3]، مزدک رازی[4]

تاریخ دریافت 1393/04/25 تاریخ پذیرش 1393/06/23

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سیکلوفسفامید در کنار نقش درمانی دارای اثرات سرکوب سیستم ایمنی، القای استرس‌اکسیداتیو، تأثیر بر DNA سلول‌های جنسی و کاهش قدرت باروری است. در این پژوهش نقش محافظتی اتیل پیروات بر روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی متعاقب شیمی‌درمانی با سیکلوفسفامید موردمطالعه قرار گرفت.

مواد و روش کار: در این مطالعه تجربی، ۳۶ سر موش سوری ماده ۸-۶ هفته‌ایی به ۳ گروه تقسیم و به مدت ۲۱ روز تیمار شدند. به گروه کنترل، روزانه سرم فیزیولوژی (۰/۱ml,IP)، به گروه کنترل شم، سیکلوفسفامید یک‌بار در هفته (۱۵mg/kg,IP) و به گروه تجربی، سیکلوفسفامید به همان روش به همراه تزریق روزانه اتیل پیروات(۴۰mg/kg,IP) تجویز شد. پس از پایان دوره درمان، تحریک تخمک‌گذاری با استفاده ازPMSG وHCG انجام شد. از ۶ سر موش سوری نر بالغ بارور جهت تهیه اسپرم نرمال استفاده شد. حیوانات پس از بیهوشی آسان‌کشی شدند و پس از استحصال تخمک و اسپرم‌های نرمال و انجام لقاح در محیط کشت HTF+4mgBSA، تخمک‌های لقاح یافته به مدت ۱۲۰ ساعت انکوبه شدند و مراحل رشد جنینی در این مدت موردبررسی قرار گرفت. آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار Minitab و روش 2proportion انجام گرفت (p<۰/۰۵).

یافته‌ها: حیوانات در گروه کنترل شم کاهش معنی‌داری در تعداد اووسیت‌های مناسب، درصد لقاح و بلاستوسیست‌ها نشان دادند و تعداد جنین‌های متوقف‌شده به‌طور قابل توجه بیشتر از گروه کنترل بود (p<۰/۰۵). برعکس، تجویز اتیل پیروات آسیب ایجادشده توسط سیکلوفسفامید را کاهش داد. حیوانات در گروه تجربی در تعداد اووسیت‌های مناسب، درصد لقاح و پیشرفت رشد جنینی افزایش نشان دادند (p<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری: تجویز اتیل‌پیروات به همراه شیمی‌درمانی با سیکلوفسفامید باعث بهبود روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی شد.

کلیدواژه‌ها: اتیل پیروات، سیکلوفسفامید، موش سوری، تخمک، لقاح داخل آزمایشگاهی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره هشتم، ص ۷۶۸-۷۶۰، آبان ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه، صندوق پستی۱۱۷۷-۵۷۱۵۵، تلفن: ۰۹۱۸۷۱۰۹۸۶۲

Email: fahimekh685@yahoo.com

مقدمه

تماس با مواد اگزوژن اعم از مواد طبیعی یا ساخته دست بشر، تأثیر عمیقی بر فرآیندهای حیاتی گذاشته و موجب کاهش توان تولیدمثلی و یا از بین رفتن آن می‌شوند (۱). در حیوان ماده درصورتی‌که در تماس با مواد شیمیایی قرار گیرد، بر سلول اووسیت که در مراحل مختلف مقدماتی، اولیه، ثانویه و یا در مرحله تخمک‌گذاری است تأثیر می‌گذارد. بیشتر مواد شیمی‌درمانی موتاژن بوده و باعث ایجاد نقص در کروموزوم‌های سلول‌های جنسی می‌شوند. مواد آلکیله کننده ازجمله سیکلوفسفامید، باعث موتاسیون ژنی، شکست کروموزومی وآنوپلوئیدی در سلول‌های سوماتیک می‌شود (۲). همچنین سیکلوفسفامید موجب نابودی فولیکول‌های مقدماتی شده و به علت کاهش ذخیره فولیکولی، تأثیر منفی روی سیستم تولیدمثلی داشته و موجب ناباروری و یائسگی زودرس در جنس ماده می‌شود (۳). در تحقیقی که بر روی خوک انجام‌گرفته دیده‌شده است که ۴۸ ساعت پس از تزریق سیکلوفسفامید در محیط کشت

[1] کارشناس ارشد بافت شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)

[2] استادیار آناتومی و علوم تشریح، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[3] دانشیار آناتومی و علوم تشریح، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[4] استادیار بافت شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 23:02 +0330 on Tuesday November 20th 2018

بر روی اووسیت، بلوغ میوز مهار می‌شود (۴). سیکلوفسفامید بر روی کروماتین اثر گذاشته و بخشی از اثرات آن در نسل بعدی F2 مشاهده شده است (۵). تزریق سیکلوفسفامید به موش‌های آزمایشگاهی آبستن در روز سیزدهم جنینی، موجب ایجاد نقص در فرآیند سیناپتونمال به‌صورت سیناپس جزئی و یا عدم سیناپس دوطرفه در روز هفدهم جنینی خواهد شد (۶). استرس اکسیداتیو درنتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در مقابل ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانتی سلول ایجاد می‌شود که منجر به تولید انواع رادیکال‌های آزاد شامل آنیون سوپراکسید (O_2)، رادیکال هیدروکسیل (OH) و مشتقات غیررادیکالی از اکسیژن مانند هیدروژن پر اکسید (H_2O_2) می‌شود. این رادیکال‌های آزاد به‌شدت ناپایدار بوده و به‌طور سریع و غیراختصاصی با مولکول‌های زیستی واکنش نشان داده و منجر به ایجاد و گسترش انواع آسیب‌های سلولی ازجمله پراکسیداسیون غشاء پلاسمایی، اکسیداسیون اسیدهای آمینه و نوکلئوتیک، آپوپتوز و نکروز می‌شود که درنهایت منجر به کاهش قدرت زیست‌پذیری و تکوین جنین‌ها در محیط کشت می‌گردد (۹-۷). اختلالات تولیدمثلی در هر دو جنس نر و ماده که به‌وسیله استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شوند گزارش شده‌اند و تأثیر سطح ROS روی زیگوت‌ها و یا در رشد ابتدایی جنین مشخص شده است. استرس اکسیداتیو می‌تواند مسئول توکسیسیتی جنینی در هیدروسالپنکس باشد (۱۰). افزودن آنتی‌اکسیدانت‌هایی نظیر ویتامین C و E به محیط کشت، نسبت تکوین بلاستوسیست در جنین‌های موش را بهبود می‌بخشد (۱۱) و موجب بهبود نسبت باروری و افزایش لانه گزینی می‌شود (۱۲). سیکلوفسفامید به‌عنوان دارویی مهم و مؤثر در درمان سرطان‌ها، علی‌رغم ایجاد بهبودی در بیماران سرطانی، در بدن به‌عنوان یک عامل تولیدکننده استرس اکسیداتیو عمل کرده و سطح تولید ROS را افزایش می‌دهد. لذا جهت تعدیل یا جلوگیری از اثرات استرس اکسیداتیو ایجادشده توسط سیکلوفسفامید آیا عاملی نظیر اتیل پیروات که دارای نقش آنتی‌اکسیدانتی هست می‌تواند مفید واقع شود؟ پیروات دارای نقش میانجی متابولیسم بوده و این ماده یک متابولیت نهایی از چرخه گلیکولیز است و سوبسترای چرخه اسید کربوکسیلیک Tricarboxilic acid (TCA) می‌باشد (۱۳). پیروات همچنین برای از بین بردن گونه‌های اکسیژن واکنش‌دهنده Reactive oxygen species(ROS) در سلول (۱۶-۱۴) عمل نموده و یک عامل ضدالتهاب می‌باشد (۱۹-۱۷). استفاده از پیروات به‌عنوان دارو به دلیل ناپایدار بودن محدود بوده و اتیل پیروات Ethyl pyruvate(EP) از اسید پیرووبک و اتانول حاصل شده است (۲۰).EP میزان زنده ماندن را بیشتر نموده و اختلالات ناشی از شوک هموراژیک (۲۱)، مسمومیت (۲۲)، پانکراتیت (۲۳) و ضربه‌ها را (۲۴) اصلاح می‌کند. علاوه بر این اتیل پیروات دارای اثرات محافظتی اعصاب در برابر مسمومیت با پاراکوات (۲۵) و آسیب ایسکمی طناب نخاعی (۲۶) می‌باشد.

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

مواد و روش کار

حیوانات:

جهت ارزیابی قدرت باروری موش‌های سوری تحت تأثیر استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز سیکلوفسفامید و نقش محافظتی اتیل پیروات در جلوگیری از اثرات سوء آن بر روند لقاح و رشد جنین‌های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی، از ۳۶ سر موش سوری نژاد NMRI ماده بارور ۸-۶ هفته‌ای که به‌طور تصادفی به ۳ گروه تقسیم و به مدت ۲۱ روز تیمار شدند، استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد با دمای $^{\circ}$C ۲±۲۲، رطوبت ۶۰-۳۰ درصد و با سیکل نوری، ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند. آب و غذا به‌صورت آزاد در دسترس بود.

گروه‌بندی و تجویزات:

به گروه اول به‌عنوان کنترل، روزانه سرم فیزیولوژی (۰/۱ml,IP)، به گروه دوم به‌عنوان کنترل شم، سیکلوفسفامید (Baxter, Germany 500mg) جهت ایجاد استرس اکسیداتیو یک‌بار در هفته(۱۵mg/kg,IP) به مدت ۳ هفته و به گروه سوم یا گروه تجربی، سیکلوفسفامید به روش گروه کنترل شم به همراه تزریق روزانه اتیل پیروات(۴۰mg/kg,IP) (SIGMA-USA-ALDRICH E47808) صورت گرفت (۲۷، ۲۸).

آماده نمودن حیوانات و محیط کشت و نمونه‌برداری:

برای انجام این مطالعه به تحریک تخمک‌گذاری نیاز بود که بدین منظور پس از پایان دوره درمان و ۷۲ ساعت قبل از IVF تزریق۷/۵ واحد (IU) هورمون PMSG (ساخت شرکتFolligon، هلند) به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر و ۴۸ ساعت بعد، تزریق ۷/۵ واحد (IU) هورمونHCG (ساخت شرکت Folligon، هلند) به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر به روش داخل صفاقی انجام شد. عمل تخمک‌گذاری ۱۳ ساعت بعد از تزریق HCG انجام شد. مرحله اول از کار برای انجام IVF، تهیه اسپرم‌های نرمال از ۶ قطعه موش سوری نر بالغ

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 23:02 +0330 on Tuesday November 20th 2018

بارور بود که به روش بیهوشی با تزریق کتامین (۲۵mg/kg/bw,IP)، آسان‌کشی شدند. سپس پوست ناحیه شکمی با اتانول ۷۰ درصد استریل و پس از ایجاد برش در ناحیه شکم و جدا کردن بافت‌های همبندی، اطراف دم اپیدیدیم همراه با مقداری از کانال دفران از بیضه جدا و به داخل پتری دیش ۳ سانتی‌متری حاوی محیط کشت HTF، دارای (sigma,USA) ۴mg/ml BSA که قبلاً جهت تعادل در داخل انکوباتور قرار داده شده بود منتقل شد و بعد از ایجاد چند برش در دم اپیدیدیم و فشار در کانال دفران برای خروج اسپرم‌ها، پتری دیش‌ها در داخل انکوباتور CO2 گذاشته شدند. بعد از گذشت ۰/۵ ساعت اسپرم‌ها خارج و در محیط پخش شدند. سپس اسپرم‌ها شستشو داده شد و با استفاده از روش شناورسازی، اسپرم‌های متحرک جدا و جهت ظرفیت‌یابی، به مدت یک ساعت در انکوباتورCO2 با دمای ۳۷°C قرار داده شدند (۲۹). در این مطالعه از نمونه‌های اسپرم نرمال با تحرک بالای ۸۰ درصد و به تعداد یک‌میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت استفاده شد. مرحله دوم از کار، تخمک گیری از موش‌های ماده بود که بدین منظور، ۱۳ ساعت پس از تزریق HCG(صبح روز بعد) با آسان کشی حیوانات بعد از بیهوشی با تزریق کتامین (۲۵mg/kg/bw,IP)، لوله‌های رحمی جدا شد و در داخل محیط کشت HTF+4mg/ml BSA با دمای ۳۷ درجه که از قبل آماده‌شده بود قرار داده شد و با استفاده از روش Dissecting تخمک‌ها خارج و پس از شستشو، به محیط لقاح در زیر روغن معدنی حاوی محیط کشت HTF (حاوی mg/ml ۴BSA) منتقل شدند و سپس اسپرم‌ها به تعداد یک‌میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت، به محیط کشت منتقل شد. عمل لقاح حدود ۵-۳ ساعت بعد از اضافه کردن اسپرم صورت گرفت و بدین ترتیب زیگوت‌ها به دست آمدند (۲۹).

بررسی نمونه‌ها:

زیگوت‌های حاصله از همه گروه‌ها، در محیط کشت HTF به مدت ۱۲۰ ساعت کشت داده شدند و برای بررسی تأثیر تنش اکسیداتیو ناشی از تجویز سیکلوفسفامید و اثر آنتی‌اکسیدانتی اتیل پیروات، در زیر میکروسکوپ فازکنتراست، مراحل رشد جنینی در این مدت مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی میزان شکافتگی، ۲۴ ساعت بعد از کشت صورت گرفت و در زیگوت‌های موجود در هر گروه، جنین‌ها ازنظر میزان فراگمانتاسیون، طی کردن مراحل رشد جنینی و تعداد جنین‌های متوقف‌شده با هم مقایسه شدند. تیپ‌بندی جنین‌های متوقف‌شده با توجه به فاکتورهای مختلفی نظیر لیز شدن جنین‌ها، نکروتیک بودن آن‌ها، فراگمانتاسیون و وجود وزیکول‌های سیتوپلاسمیک صورت گرفت و به‌این‌ترتیب، تیپ I جنین‌های با لیز، فراگمانته شدن ونکروتیک بودن کامل، تیپ II جنین‌های با لیز و فراگمانته شدن در تعدادی از بلاستومرها و تیپ III جنین‌های با تعداد کمی بلاستومرهای لیز و فراگمانته و وزیکول سیتوپلاسمیک بود (۲۹). کیفیت جنین‌ها، تعداد جنین‌های رشد کرده، درصد شکافتگی با بررسی درصد جنین‌های دوسلولی، میزان جنین‌های متوقف‌شده و درصد بلاستوسیست‌های ایجادشده در طی ۱۲۰ ساعت انکوباسیون در هر گروه مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار Minitab و روش 2proportion و در سطح معنی‌دار p<۰/۰۵ انجام گرفت و نتایج به‌صورت تعداد (درصد) در جدول مربوطه آورده شد.

یافته‌ها

بررسی میزان لقاح و رشد جنین‌ها تا مرحله بلاستوسیست:

در این مطالعه مشخص شد که درصد اووسیت‌های مناسب، لقاح، رویان‌های دوسلولی و درصد بلاستوسیست‌ها در گروه کنترل شم در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (p<۰/۰۵). در گروه تجربی درصد اووسیت‌های مناسب، لقاح و بلاستوسیست‌ها دارای کاهش معنی‌دار (p<۰/۰۵) و درصد رویان‌های دوسلولی فاقد اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل بود. تجویز اتیل پیروات سبب شد که درصد لقاح، دوسلولی و بلاستوسیست‌ها در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل شم، افزایش معنی‌داری را نشان دهد (p<۰/۰۵) و افزایش درصد اووسیت‌های مناسب در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل شم فاقد اختلاف معنی‌دار بود (جدول ۱).

بررسی میزان و انواع جنین‌های متوقف‌شده از رشد:

در گروه کنترل شم، تعداد کل جنین‌های متوقف شده در مقایسه با گروه کنترل (تصویر۱ -A) افزایش معنی‌داری داشت واکثر جنین‌های متوقف شده از تیپ I و II با درصد بالایی از لیز و فراگمانتاسیون بودند (تصویر۱-B)، در حالی که تجویز اتیل پیروات در گروه تجربی سبب کاهش معنی‌دار تعداد جنین‌های متوقف شده در مقایسه با گروه کنترل شم گردید و جنین‌های متوقف شده دارای کیفیت بهتر و اکثراً از تیپ III بودند (p<۰/۰۵)، (جدول۲)، (تصویر۱ -C).

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 23:02 +0330 on Tuesday November 20th 2018

جدول (۱): نتایج حاصل از بررسی کیفیت اووسیت و لقاح داخل آزمایشگاهی و روند رشد جنینی در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

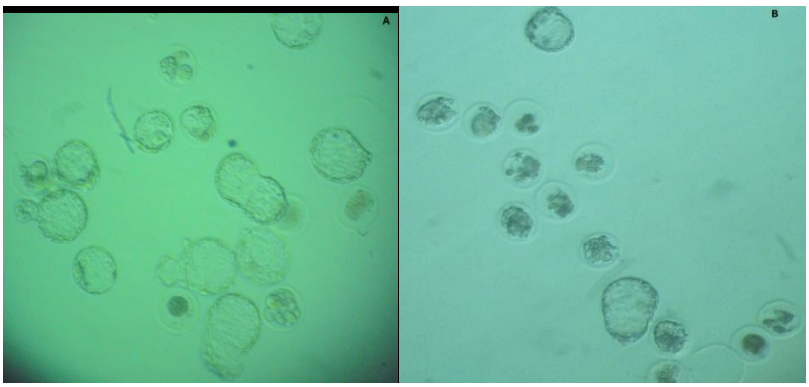
	حیوان	کل اووسیت	اووسیت مناسب	لقاح	دوسلولی	بلاستوسیست
گروه	تعداد	تعداد	تعداد (٪)	تعداد (%)	تعداد (%)	تعداد (%)
کنترل	۱۲	۲۱۳	(۹۸/۱۲)۲۰۹	(۹۵/۲۱)۱۹۹	(۹۱/۴۵)۱۸۲	(۶۵/۸۲)۱۳۱
کنترل شم	۱۲	۱۵۲	a(۸۶/۱۸)۱۳۱	a(۷۸/۶۲)۱۰۳	a(۷۹/۶۱)۸۲	a(۲۴/۲۷)۲۵
تجربی	۱۲	۲۴۰	a(۹۱/۲۴)۲۱۹	ab(۸۶/۳)۱۸۹	b(۸۷/۸۳)۱۶۶	ab(۴۷/۰۸)۸۹

حروف a و b نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار به ترتیب با گروه‌های کنترل و کنترل شم می‌باشد (p<۰/۰۵).

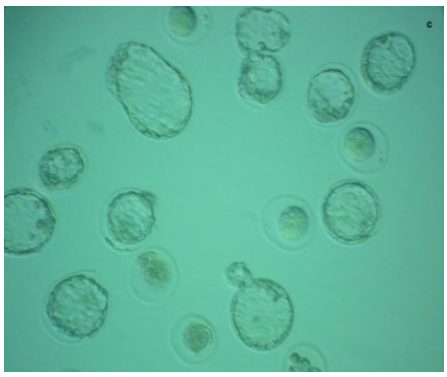
جدول (۲): مقایسه گروه‌های مختلف از نظر درصد و نوع توقف جنینی.

	جنین متوقف شده	تیپ I	تیپ II	تیپ III
گروه	تعداد (٪)	تعداد (٪)	تعداد (٪)	تعداد (٪)
کنترل	(۳۴/۱۷)۶۸	(۱)۲	(۳/۵۱)۷	(۲۹/۶۴)۵۹
کنترل شم	a(۷۵/۷۲)۷۸	a(۴۳/۶۸)۴۵	a(۲۰/۳۸)۲۱	a(۱۱/۶۵)۱۲
تجربی	ab(۵۲/۹۱)۱۰۰	ab(۶/۳۴)۱۲	a(۱۲/۶۹)۲۴	b(۳۳/۸۶)۶۴

حروف a و b نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار به ترتیب با گروه‌های کنترل و کنترل شم می‌باشد (p<۰/۰۵).



A B



C

تصویر (۱): A-گروه کنترل، تمایز درصدی از جنین‌ها به بلاستوسیست با کیفیت مناسب بعد از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون و درصدی از جنین‌ها که در مراحل مختلف رشد متوقف شده‌اند (×۴۰۰)، B- گروه کنترل شم، درصد کمی از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیده و بلاستوسیست‌های حاصله کیفیت مناسبی از نظر مورفولوژی ندارند و درصد بالایی از جنین‌ها متوقف شده‌اند و جنین‌های متوقف شده دارای لیز و فراگمانتاسیون زیاد و اکثراً از تیپI وII می‌باشند (×۱۰۰)، C-گروه درمان شده با سیکلوفسفامید به همراه اتیل پیروات (تجربی) که در مقایسه با گروه کنترل شم، درصد بالایی از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیده و بلاستوسیست‌های حاصله کیفیت مناسبی از نظر مورفولوژی دارند و درصد کمی از جنین‌ها متوقف شده‌اند (×۴۰۰).

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 23:02 +0330 on Tuesday November 20th 2018

بحث و نتیجه گیری

استرس اکسیداتیو به معنای افزایش در سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن بدن است که از میزان دفاع آنتی‌اکسیدانتی بدن تجاوز می‌کند (۳۰). انکوباسیون گامت ها در IVF باعث تولید رادیکال‌های آزاد فراوان در پیرامون زیگوت در حال رشد گردیده و موجب به مخاطره افتادن میزان زنده ماندن جنین‌ها می‌شود. ملاتونین به‌عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدانتی رادیکال‌های آزاد را حذف نموده و موجب بالا رفتن درصد زنده ماندن جنین‌های در حال رشد گردید (Cheuqueman۳۱). در یک مطالعه دیگر مشخص گردید که افزودنی‌های غذایی با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی موجب افزایش کیفیت اسپرم و بهبود نتایج IVF می‌گردد (Wirleitner۳۲). افزایش میزان ROS در سلول‌های گرانولوزا در زنان موجب عدم موفقیت IVF گردید (Karuputhula۳۳). بنابراین، بر اساس مطالعات انجام شده استرس اکسیداتیو دارای اثرات منفی بر نتایج IVF گردیده و آنتی‌اکسیدانت‌ها باعث موجب بهبود این نتایج می‌شوند. سیکلوفسفامید به‌عنوان یک عامل ایجاد کننده استرس اکسیداتیودر برخی از مشکلات مختلف تولیدمثلی نظیر آندومتریوز، اختلال در فولیکولوژنز و ایجاد بلوغ غیر طبیعی تخمک، هیدروسالپینگسی[۱]، نکروزواسپرمیا[۲] و آستنواسپرمیا[۳] دخالت دارد (۸،۳۴). همچنین مشخص شده که سیکلوفسفامید دارای خصوصیات سرکوب کننده ایمنی است که بخشی از این ویژگی به القاء استرس اکسیداتیو آن مربوط می‌شود (۳۵). با توجه به اثر سیکلوفسفامید بر کروماتین سلول‌های جنسی وشکست DNA در هسته سلول اووسیت، بخشی از اثرات آن در نسل بعدی F2 ظاهر می‌گردد (۵). در مطالعه‌ایی مشخص شده است که تخمک‌هایی که تحت تأثیر سیکلوفسفامید قرار گرفته بودند، پس از استخراج در محیط کشت، تقسیم میوز در آن‌ها ۴۸ ساعت بعد مهار شد در حالی که برخلاف حیوانات ممکن است در انسان بارداری ادامه پیدا کرده و در نتیجه تحت تأثیر عوامل شیمی‌درمانی، تکامل جنین‌ها مختل شده وآنومالی در آن‌ها ایجاد شود (۱). این مطالعه برای تعدیل اثرات ثانویه ناشی از استرس اکسیداتیو اعمال شده توسط سیکلوفسفامید بر روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی با استفاده از اتیل پیروات انجام گرفت. اتیل پیروات به‌عنوان یک سوبسترا برای سیکل کربس در میتوکندری عمل می‌کند و با بهبود شرایط میتوکندری ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی سلول‌ها را بالا می‌برد (۳۶)، این ماده باعث کاهش آپوپتوز سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو گردیده است (۳۷). در این بررسی میزان رشد و کیفیت جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی در گروه کنترل شم، کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد ($p<۰/۰۵$) و این مشاهدات بیانگر اثر سمی سیکلوفسفامید بر فعالیت تولیدمثلی از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو می‌باشد که با تجویز همزمان اتیل پیروات به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت، این اثر سمی دارو تخفیف پیدا نموده و سبب افزایش کیفیت و رشد جنین‌ها در محیط آزمایشگاه گردید. تزریق سیکلوفسفامید با دز بالا به موش‌های سوری ماده، اساساً بر فولیکول‌های مقدماتی تأثیر نموده وسایر شاخصه‌های تخمدانی از قبیل تخمک‌گذاری، انتقال تخمک و تنظیمات نوروآندوکرینی مختل می‌گردد (۳۸). در مطالعه ای‌ای که اثر اسانس مرزه خوزستانی بر وضعیت لقاح داخل آزمایشگاهی موش‌های سوری ماده بالغ درمان شده با بوسولفان انجام شده مشخص شده است که تجویز عصاره مرزه به همراه شیمی‌درمانی با بوسولفان، باعث بهبود روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی می‌شود (۳۹). در بررسی دیگری نیز تجویز عصاره مرزه خوزستانی به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی و موثربه همراه شیمی‌درمانی با سیکلوفسفامید، باعث تخفیف سمیت تولیدمثلی ایجاد شده توسط سیکلوفسفامید در موش‌های سوری نر شد (۴۰). تحقیقات دیگری که در زمینه تعدیل یا جلوگیری از اثرات جانبی داروهای شیمی‌درمانی توسط عواملی که نقش آنتی‌اکسیدانتی دارند انجام شده، نشان دهنده اثرات سمی سیکلوفسفامید روی مورفولوژی اسپرم و بافت تخمدان بود که توسط لیکوپن و اسید الاژیک (Ellagic acid and Lycopene)به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت، محافظت گردید (۴۱). همچنین نقش محافظتی اسید آسکوربیک به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت بر اثرات توکسیک سیکلوفسفامید روی اختلالات آندروژنیک و گامتوژنیک تخمدان در رت ها توسط Das مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص گردید که سیکلوفسفامید از فعالیت آنزیم D5, 3b-hydroxysteroid dehydrogenase (D5, 3b-HSD) ونیز 17b-HSD در تخمدان جلوگیری می‌نماید. همچنین به‌طور معنی‌دار از فعالیت پراکسیداز و کاتالاز جلوگیری نموده و سطح مالون دی آلدئید را بالا می‌برد. تمامی این تغییرات با درمان توسط اسید آسکوربیک به‌طور همزمان با سیکلوفسفامید بر عکس شدند (۴۲). نقش محافظتی ویتامین E نیز در برابراسترس اکسیداتیو ناشی از تجویز سیکلوفسفامید در موش‌های سوری به اثبات رسیده است. این عمل ویتامینE ممکن است در نتیجه تخریب رادیکال‌های آزاد و نیز تحریک آزادسازی گونادوتروپین‌های لوب قدامی هیپوفیز باشد (۴۳). افزودن

[۱] Hydrosalpingeal fluid
[۲] Necrozoospermia
[۳] Astenospermia

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 23:02 +0330 on Tuesday November 20th 2018

آنتی‌اکسیدانت‌هایی نظیر ویتامین C، E و هایپوتائورین به محیط کشت، نسبت تکوین بلاستوسیست در جنین‌های موش را بهبود می‌بخشد (۱۱،۴۴) وحضور آنتی‌اکسیدانت ها در محیط کشت موجب بهبود نسبت باروری و افزایش لانه گزینی می‌شود (۱۲). با در نظر گرفتن تمامی نتایج به دست آمده به همراه تفسیر آن‌ها، مطالعه حاضر این ایده را تقویت می‌کند که سمیت تولیدمثلی ناشی از تجویز سیکلوفسفامید به واسطهٔ استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد و یک آنتی‌اکسیدانت قوی مانند اتیل پیروات می‌تواند سیستم تولیدمثلی را از آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط سیکلوفسفامید که اغلب موجب ناباروری می‌شود، محافظت نماید به‌طوری که در مطالعه حاضر اتیل پیروات توانست در افزایش کیفیت سلول‌های جنسی، میزان لقاح، بهبود روند رشد جنین‌ها در محیط آزمایشگاه و کاهش توقف در مراحل مختلف رشد جنینی، مؤثر باشد.

References:

1. pryor JL, Hughes F, Hales BF, Robaire B. Critical windows of exposure for children's health. Enviromental Health. Perspective supple 2000; 3: 491-503.
2. Ben-Yehuda D, Krichevsky S, Caspi O, Rund D, Polliack A, Abeliovich D, et al. Microsatellite instability and p53 mutations in therapy-related leukemia suggest mutator phenotype. Blood 1996; 88(11): 4296-303.
3. Apperley JF, Reddy N. Mechanism and management of treatment-related gonadal failure in recipitants of high dose chemotherapy. Blood Rev 1995; 9: 93-116.
4. Chen WY, Yang JG, Huang SH, Li PS. Effects of cyclophosphamide on maturation and subsequent fertilizing capacity of pig oocytes in vitro. Chin J Physiol 1998;41(2):75–83.
5. Hales BF, Crosman K, Robaire B. Increased postimplantation loss and malformations among the F2 progeny of male rats chronically treated with cyclophosphamide. Teratology 1992; 45(6): 671-8.
6. Johannisson R, Ocker H. Cyclophosphamide-induced aberrations of chromosome pairing in pachytene oocytes. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. Mutat Res 1997; 374(2): 185-92.
7. Abdoon AS, Kandil OM, Otoi T, Suzuki T. Influence of oocyte quality, culture media and gonadotropins on cleavage rate and development of in vitro fertilized buffalo embryos. Anim Reprod Sci 2001;65(3-4):215–23.
8. Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum Reprod Update 2001;7(2):175–89.
9. Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants from chemical to biochemical mechanisms. Food and Chemical Toxicology 1999; 37(9): 949-62.
10. Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, et al. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. Int J Fertil Womens Med 2000;45(5):314–20.
11. Wang X, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress–induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. Fertility and sterility 2002; 78(6): 1272-7.
12. Catt JW, Henman M. Toxic effects of oxygen on human embryo development. Hum Reprod 2000;15 Suppl 2:199–206.
13. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science 2009; 324(5930): 1029-33.
14. Wang X, Perez E, Liu R, Yan L-J, Mallet RT, Yang S-H. Pyruvate protects mitochondria from

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 23:02 +0330 on Tuesday November 20th 2018

oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. Brain Res 2007; 1132: 1-9.

15. Hinoi E, Takarada T, Tsuchihashi Y, Fujimori S, Moriguchi N, Wang L, et al. A molecular mechanism of pyruvate protection against cytotoxicity of reactive oxygen species in osteoblasts. Mol Pharmacol 2006;70(3):925–35.
16. Jagtap JC, Chandele A, Chopde B, Shastry P. Sodium pyruvate protects against H(2)O(2) mediated apoptosis in human neuroblastoma cell line-SK-NMC. J Chemic Neuroanatomy 2003; 26(2): 109-18.
17. Wang Q, Van Hoecke M, Tang XN, Lee H, Zheng Z, Swanson RA, et al. Pyruvate protects against experimental stroke via an anti-inflammatory mechanism. Neurobiol disease 2009; 36(1): 223-31.
18. Das UN. Pyruvate is an endogenous anti-inflammatory and anti-oxidant molecule. Med Sci Monit 2006; 12(5): 79-84.
19. Gupta S, Rastogi S, Prakash J, Joshi S, Gupta Y, Awor L, et al. Antiinflammatory activity of sodium pyruvate a physiological antioxidant. Indian J Physiol Pharmacol 2000; 44: 101–4.
20. Fink MP. Ethyl pyruvate: a novel treatment for sepsis, Curr. Drug Targets 2007; 8: 515–8.
21. Cai B, Brunner M, Wang H, Wang P, Deitch EA, Ulloa L. Ethyl pyruvate improves survival in awake hemorrhage. J Mol Med 2009; 87: 423–33.
22. Andersson A, Fenhammar J, Frithiof R, Sollevi A, Hjelmqvist H. Haemodynamic and metabolic effects of resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate in the acute phase of porcine endotoxaemic shock. Acta Anaesthesiol. Scand 2006; 50: 1198–206.
23. Cheng B-Q, Liu C-T, Li W-J, Fan W, Zhong N, Zhang Y, et al. Ethyl pyruvate improves survival and ameliorates distant organ injury in rats with severe acute pancreatitis. Pancreas 2007; 35: 256–61.
24. Kim J-B, Yu Y-M, Kim S-W, Lee J-K. Anti-inflammatory mechanism is involved in ethyl pyruvate-mediated efficacious neuroprotection in the postischemic brain. Brain Res 2005;1060(1-2):188–92.
25. Lee J, Kwon W, Jo Y, Suh G, Youn Y. Protective effects of ethyl pyruvate treatment on paraquat-intoxicated rats. Hum Exp Toxicol 2008;27(1):49–54.
26. Wang Q, Ding Q, Zhou Y, Gou X, Hou L, Chen S, et al. Ethyl pyruvate attenuates spinal cord ischemic injury with a wide therapeutic window through inhibiting high-mobility group box 1 release in rabbits. Anesthesiology 2009;110(6):1279–86.
27. Hosseinzadeh H, Abootorabi A, Sadeghnia HR. Protective effect of Crocus sativus stigma extract and crocin (trans-crocin 4) on methyl methanesulfonate-induced DNA damage in mice organs. DNA Cell Biol 2008;27(12):657–64.
28. Yang R, Shaufl AL, Killeen ME, Fink MP. Ethyl pyruvate ameliorates liver injury secondary to severe acute pancreatitis. J Surg Res 2009;153(2):302–9.
29. Hedrich H. The laboratory mouse: handbook of experimental animals. 2nd ed. New York: Academic Press; 2006. P. 439-446.
30. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil Steril 2003;79(4):829–43.
31. Cheuqueman C, Arias ME, Risopatron J, Felmer R, Alvarez J, Mogas T, et al. Supplementation of IVF medium with melatonin: effect on sperm functionality and in vitro produced bovine embryos. Andrologia 2014.
32. Wirleitner B, Vanderzwalmen P, Stecher A, Spitzer D, Schuff M, Schwerda D, et al. Dietary supplementation of antioxidants improves semen quality of IVF patients in terms of motility, sperm

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 23:02 +0330 on Tuesday November 20th 2018

count, and nuclear vacuolization. Int J Vitam Nutr Res 2012; 82(6): 391-8.

33. Karuputhula NB, Chattopadhyay R, Chakravarty B, Chaudhury K. Oxidative status in granulosa cells of infertile women undergoing IVF. Syst Biol Reprod Med 2013; 59(2): 91-8.
34. Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. Free Radic Biol Med 1993;15(1):69–75.
35. Merwid-Ląd A, Trocha M, Chlebda E, Sozański T, Magdalan J, Ksiądzyna D, et al. Effects of morin-5'-sulfonic acid sodium salt (NaMSA) on cyclophosphamide-induced changes in oxido-redox state in rat liver and kidney. Hum Exp Toxicol 2012;31(8):812–9.
36. Olek RA, Ziolkowski W, Wierzba TH, Kaczor JJ. Effect of ethyl pyruvate on skeletal muscle metabolism in rats fed on a high fat diet. Nutrients 2013; 5(7): 2372-83.
37. Wang L-Z, Sun W-C, Zhu X-Z. Ethyl pyruvate protects PC12 cells from dopamine-induced apoptosis. Eur J Pharmacol 2005;508(1-3):57–68.
38. Perreault SD, Goldman JM. Ovulation, oocyte maturation and oocyte function. comprehensive Toxicology 1997; 10: 305-16.
39. Bamohabat S. Study on prohibition and restoration effect of saturejakhuzestanica's extract against ovarian and fertility defects induced by experienced chemotherapy by busulfan in mice (Dissertation). Urmia: Urmia Univ; 2012. (Persian)
40. Rezvanfar MA. Protective effect of saturejakhuzestanica essential oil on oxidative stress induced spermatogenic disorders and fertility potential of cyclophosphamide-treated male wistar rat (Dissertation). Urmia: Urmia Univ; 2009. (Persian)
41. Türk G, Ceribaşi AO, Sakin F, Sönmez M, Ateşşahin A. Antiperoxidative and anti-apoptotic effects of lycopene and ellagic acid on cyclophosphamide-induced testicular lipid peroxidation and apoptosis. Reprod Fertil Dev 2010;22(4):587–96.
42. Das UB, Mallick M, Debnath JM, Ghosh D. Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide- induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. Asian J Androl 2002;4(3):201–7.
43. Li DJ, Xu ZS, Zhang ZH, Huang QY. Antagonistic effects of vitamin E on the testicular injury by cyclophosphamide in mice. Zhonghua Nan Ke Xue 2006; 12(4): 318-22.
44. Ahmadi A, Sadrkhanloo R. Antioxidative effect of Hypotaurin on suppression of oxidative tension-induced damage on the development of mouse embryo fertilized in vitro. Urmia Med J 2010; 21(4): 306-17. (Persian)

Original Article

EVALUATION OF PROTECTIVE EFFECTS OF ETHYL PYRUVATE ON EMBYO DEVELOPING PROCESS IN IN VITRO FERTILIZATION (IVF) IN CYCLOPHOSPHAMIDE TREATED MICE

*Fahmie Khan Mohammadi Ghane *[1], Abbas Ahmadi[2], Easool Shahrooz[3], Mazdak Razi [4]*

Received: 16 Jul , 2014; Accepted: 14 Sep , 2014

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 23:02 +0330 on Tuesday November 20th 2018

Abstract

Background & Aims: Cyclophosphamide (CP) has been known as an immunosuppressant agent, and is reported to induce oxidative stress. It also impacts gonadal cells nucleus and reduce the fertilizing potential. Therefore, the present study was aimed to evaluate the protective effects of Ethyl Pyruvate as a potential antioxidant on in vitro fertilized embryos development following exposure to CP.

Material & Methods: In this study, 36 mature female mice, aged 6-8 weeks were divided into 3 groups and treated for 21 days. The control animals received saline normal (0.1 ml,ip/day), and sham control group received CYPalone (15mg/kg,ip/week) and the experimental group received Ethyl Pyruvate (40mg/kg,ip/day) along with CP (15 mg/kg,ip/week). PMSG and HCG were administrated for stimulating the ovulation process. The sperms were obtained from 6 mature male mice. Following oocyte collection *in-vitro* fertilizing was performed using HTF+4mg/ml BSA medium. The fertilized oocytes were incubated for 120 hours and embryos were studied in various stages. Two proportion tests were used for statistical analyses by Minitab software ($p<0.05$).

Results: The animals in CP-treated group revealed significant decrease in appropriate oocyte number, fertilizing percentage, blastocyst and exhibited remarkably higher numbers of blocked embryos in comparison to the control group ($P<0.05$). In contrast, the Ethyl Pyruvate administration reversed the **CP**-induced damages. The animals in Ethyl Pyruvate -treated group revealed increased number of appropriate oocytes, percentage of fertilizing and improved embryo development ($P<0.05$).

Conclusion: The Ethyl Pyruvate co-administration with CP resulted in significant improvement in fertilizing potential and promoted the embryo development.

Keywords: Cyclophosphamide, Ethyl Pyruvate, Mice, Oocyte, In vitro fertilizing

Address: Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, Tel: +989187109862

Email: Fahimekh685@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2014: 25(8): 768 ISSN: 1027-3727

[1] *MSc in Histology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)*

[2] *Assistant Professor of Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*

[3] *Associate Professor of Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*

[4] *Assistant Professor of Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*