

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

فهیمه خان‌محمدی قانع<sup>۱\*</sup>، عباس احمدی<sup>۲</sup>، رسول شهروز<sup>۳</sup>، مزدک رازی<sup>۴</sup>

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 استرس اکسیداتیو، تأثیر بر DNA سلول‌های جنسی و کاهش قدرت باروری است. در این پژوهش نقش محافظتی اتیل پیرووات بر روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی متعاقب شیمی‌درمانی با سیکلوفسفامید مورد مطالعه قرار گرفت.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه تجربی، ۳۶ سر موش سوری ماده ۸-۶ هفته‌هایی به ۳ گروه تقسیم و به مدت ۲۱ روز تیمار شدند. به گروه کنترل، روزانه سرم فیزیولوژی (۰/۱ ml, IP)، به گروه کنترل شم، سیکلوفسفامید یک‌بار در هفته (۱۵ mg/kg, IP) و به گروه تجربی، سیکلوفسفامید به همان روش به همراه تزریق روزانه اتیل پیرووات (۴۰ mg/kg, IP) تجویز شد. پس از پایان دوره درمان، تحریک تخمک‌گذاری با استفاده از PMSG و HCG 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 مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار Minitab و روش 2proportion انجام گرفت ( $p < 0/05$ ).

**یافته‌ها:** حیوانات در گروه کنترل شم کاهش معنی‌داری در تعداد اووسیت‌های مناسب، درصد لقاح و بلاستوسیت‌ها نشان دادند و تعداد جنین‌های متوقف‌شده به‌طور قابل توجه بیشتر از گروه کنترل بود ( $p < 0/05$ ). برعکس، تجویز اتیل پیرووات آسیب ایجادشده توسط سیکلوفسفامید را کاهش داد. حیوانات در گروه تجربی در تعداد اووسیت‌های مناسب، درصد لقاح و پیشرفت رشد جنینی افزایش نشان دادند ( $p < 0/05$ ).

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

**کلیدواژه‌ها:** اتیل پیرووات، 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 پستی ۱۱۷۷-۵۷۱۵۵، تلفن: ۰۹۱۸۷۱۰۹۸۶۲

Email: fahimekh685@yahoo.com

### مقدمه

سلول‌های جنسی می‌شوند. مواد آلیکله کننده از جمله سیکلوفسفامید، باعث موتاسیون ژنی، شکست کروموزومی و آنوپلوئیدی 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 انجام گرفته دیده شده است که ۴۸ ساعت پس از تزریق سیکلوفسفامید در محیط کشت

تماس با مواد آگروژن 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 در صورتی که 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 موثرن بوده و باعث ایجاد نقص در کروموزوم‌های

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد بافت شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)

<sup>۲</sup> استادیار آناتومی و علوم تشریح، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

<sup>۳</sup> دانشیار آناتومی و علوم تشریح، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

<sup>۴</sup> استادیار بافت شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

شوک هموراژیک (۲۱)، مسمومیت (۲۲)، پانکراتیت (۲۳) و ضربه‌ها را (۲۴) اصلاح می‌کند. علاوه بر این اتیل پیرووات دارای اثرات محافظتی اعصاب در برابر مسمومیت با پاراکوات (۲۵) و آسیب ایسکمی طناب نخاعی (۲۶) می‌باشد.

از آنجایی که تا به حال مطالعه‌ای در زمینه تأثیر اتیل پیرووات 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 پیرووات بر بهبود روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی در موش‌های تحت درمان با سیکلوفسفامید مورد مطالعه 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 پیرووات 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  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ، 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 (IP, 1ml/0)، به گروه دوم به‌عنوان کنترل شم، سیکلوفسفامید (Baxter, Germany 500mg) جهت ایجاد استرس اکسیداتیو یک‌بار در هفته (IP, 15mg/kg) به مدت ۳ هفته و به گروه سوم یا گروه تجربی، سیکلوفسفامید به روش گروه کنترل شم به همراه تزریق روزانه اتیل پیرووات (IP, 40mg/kg) (-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 تزریق ۷/۵ واحد (IU) هورمون PMSG (ساخت شرکت Folligon، هلند) به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر و ۴۸ ساعت بعد، تزریق ۷/۵ واحد (IU) هورمون HCG (ساخت شرکت Folligon، هلند) به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر به روش داخل صفاقی انجام شد. عمل تخمک‌گذاری ۱۳ ساعت بعد از تزریق HCG انجام شد. مرحله اول از کار برای انجام IVF، تهیه اسپرم‌های نرمال از ۶ قطعه موش سوری نر بالغ

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 در نتیجه 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 ( $\text{O}_2^-$ )، رادیکال هیدروکسیل (OH) و مشتقات غیررادیکالی از اکسیژن مانند هیدروژن پر اکسید ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 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 از جمله پراکسیداسیون غشاء پلاسمایی، اکسیداسیون اسیدهای آمینه و نوکلئوتیک، آپوپتوز و نکروز می‌شود که در نهایت منجر به کاهش قدرت زیست‌پذیری و تکوین جنین‌ها در محیط کشت می‌گردد (۷-۹). 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 لانه‌گزینی 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 پیرووات که دارای نقش آنتی‌اکسیدانتی هست می‌تواند مفید واقع شود؟ پیرووات دارای نقش میانجی متابولیسم بوده و این ماده یک متابولیت نهایی از چرخه گلیکولیز است و سوبسترای چرخه اسید کربوکسیلیک Tricarboxylic acid (TCA) می‌باشد (۱۳). پیرووات همچنین برای از بین بردن گونه‌های اکسیژن واکنش‌دهنده Reactive oxygen species (ROS) در سلول (۱۶-۱۴) عمل نموده و یک عامل ضدالتهاب می‌باشد (۱۷-۱۹). استفاده از پیرووات به‌عنوان دارو به دلیل ناپایدار بودن محدود بوده و اتیل پیرووات Ethyl pyruvate (EP) از اسید پیروویک و اتانول حاصل شده است (۲۰). EP میزان زنده ماندن را بیشتر نموده و اختلالات ناشی از

نظیر لیز شدن جنین‌ها، نکروتیک بودن آن‌ها، فراگمانتاسیون و وجود وزیکول‌های سیتوپلاسمیک صورت گرفت و به این ترتیب، تیپ I جنین‌های با لیز، فراگمانته شدن و نکروتیک 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 متوقف شده و درصد بلاستوسیست‌های ایجاد شده 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  $p < 0.05$  انجام گرفت و نتایج به صورت 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 به طور معنی‌داری کاهش یافت ( $p < 0.05$ ). در گروه تجربی درصد اووسیت‌های مناسب، لقاح و بلاستوسیست‌ها دارای کاهش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) و درصد رویان‌های دوسلولی فاقد اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل بود. تجویز اتیل پیرووات سبب شد که درصد لقاح، دوسلولی و بلاستوسیست‌ها در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل شم، افزایش معنی‌داری را نشان دهد ( $p < 0.05$ ) 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 متوقف شده از رشد:

در گروه کنترل شم، تعداد کل جنین‌های متوقف شده در مقایسه با گروه کنترل (تصویر ۱-A) افزایش معنی‌داری داشت و اکثر جنین‌های متوقف شده از تیپ I و II با درصد بالایی از لیز و فراگمانتاسیون بودند (تصویر ۱-B)، در حالی که تجویز اتیل پیرووات 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 ( $p < 0.05$ )، (جدول ۲)، (تصویر ۱-C).

بارور بود که به روش بیهوشی با تزریق کتامین ( $25\text{mg/kg/bw, IP}$ )، 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)  $4\text{mg/ml BSA}$  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  $\text{CO}_2$  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 انکوباتور  $\text{CO}_2$  با دمای  $37^\circ\text{C}$  قرار داده شدند (۲۹). در این مطالعه از نمونه‌های اسپرم نرمال با تحرک بالای ۸۰ درصد و به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت استفاده شد. مرحله دوم از کار، تخمک‌گیری از موش‌های ماده بود که بدین منظور، ۱۳ ساعت پس از تزریق HCG (صبح روز بعد) با آسان‌کشی حیوانات بعد از بیهوشی با تزریق کتامین ( $25\text{mg/kg/bw, IP}$ )، لوله‌های رحمی جدا شد و در داخل محیط کشت  $\text{HTF} + 4\text{mg/ml BSA}$  با دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه که از قبل آماده شده 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  $4\text{mg/ml BSA}$ ) منتقل شدند و سپس اسپرم‌ها به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت، به محیط کشت منتقل شد. عمل لقاح حدود ۳-۵ 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 پیرووات، 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 از نظر میزان فراگمانتاسیون، طی کردن مراحل رشد جنینی و تعداد جنین‌های متوقف شده با هم مقایسه شدند. تیپ‌بندی جنین‌های متوقف شده با توجه به فاکتورهای مختلفی

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

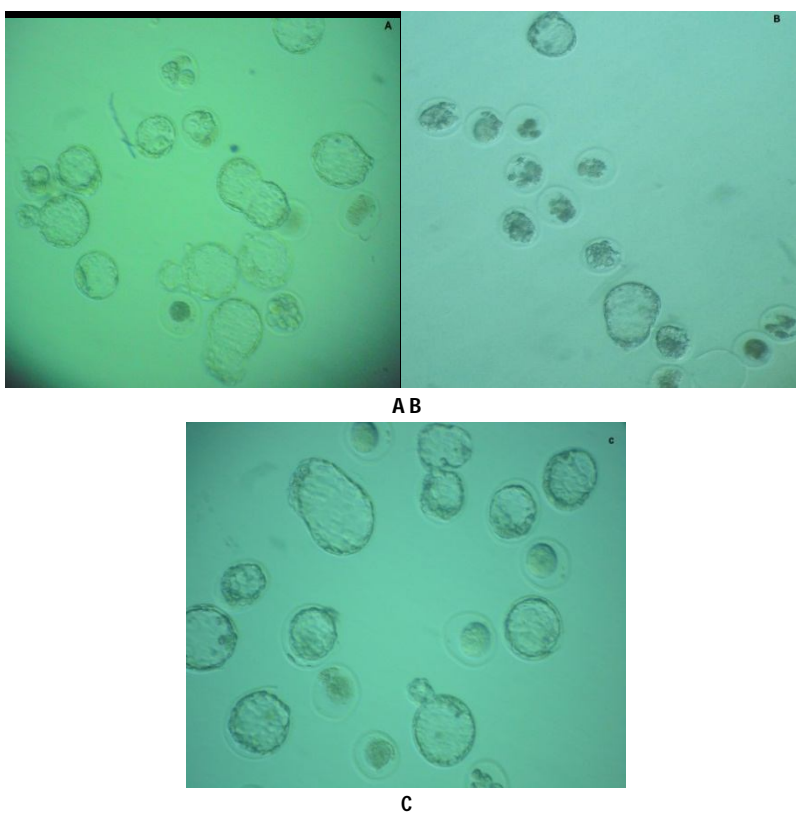
گروه	حیوان	کل اووسیت	اووسیت مناسب	لقاح	دوسلولی	بلاستوسیست
تعداد	تعداد	تعداد (%)	تعداد (%)	تعداد (%)	تعداد (%)	تعداد (%)
کنترل	۱۲	۲۱۳	۲۰۹ (۹۸/۱۲)	۱۹۹ (۹۵/۲۱)	۱۸۲ (۹۱/۴۵)	۱۳۱ (۶۵/۸۲)
کنترل شم	۱۲	۱۵۲	۱۳۱ (۸۶/۱۸)	۱۰۳ (۷۸/۶۲)	۸۲ (۷۹/۶۱)	۲۵ (۲۴/۲۷)
تجربی	۱۲	۲۴۰	۲۱۹ (۹۱/۲۴)	۱۸۹ (۷۹/۳)	۱۶۶ (۸۷/۸۳)	۸۹ (۴۷/۰۸)

حروف a و b نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار به ترتیب با گروه‌های کنترل و کنترل شم می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

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

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

حروف a و b نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار به ترتیب با گروه‌های کنترل و کنترل شم می‌باشد ( $p < 0.05$ ).



**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 (B- گروه کنترل شم،  $\times 400$ )، 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 تیپ I و II می‌باشند ( $\times 100$ )، 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 ( $\times 400$ ).

## 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 گامت‌ها 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 (Cheuqueman ۳۱). در یک مطالعه دیگر مشخص گردید که افزودنی‌های غذایی با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی موجب افزایش کیفیت اسپرم و بهبود نتایج IVF می‌گردد (Wirleitner ۳۲). افزایش میزان ROS در سلول‌های گرانولوزا در زنان موجب عدم موفقیت IVF گردید (Karuputhula ۳۳). 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 اکسیداتیو در برخی از مشکلات مختلف تولیدمثلی نظیر آندومتروز، اختلال در فولیکولوژن و ایجاد بلوغ غیر طبیعی تخمک، هیدروسالپینگیس<sup>۱</sup>، نکروزواسپرمیا<sup>۲</sup> و آستنواسپرمیا<sup>۳</sup> 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 و شکست DNA در هسته سلول اووسیت، بخشی از اثرات آن در نسل بعدی F2 ظاهر می‌گردد (۵). در مطالعه‌ای 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 و آنومالی 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 ( $p < 0.05$ ) 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 و سایر شاخصه‌های تخمدانی از قبیل تخمک‌گذاری، انتقال تخمک و تنظیمات نورآندوکروینی 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 موثر به 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 رت‌ها توسط Das مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص گردید که سیکلوفسفامید از فعالیت آنزیم D5, 3b-hydroxysteroid dehydrogenase (D5, 3b-HSD) و نیز 17b-HSD در تخمدان جلوگیری می‌نماید. همچنین به‌طور معنی‌دار از فعالیت پراکسیداز و کاتالاز جلوگیری نموده و سطح مالون دی‌آلدئید 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 برابر استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز سیکلوفسفامید در موش‌های سوری به اثبات رسیده است. این عمل ویتامین E ممکن است در نتیجه تخریب رادیکال‌های آزاد و نیز تحریک آزادسازی گونادوتروپین‌های لوب قدامی هیپوفیز باشد (۴۳). افزودن

<sup>۱</sup> Hydrosalpingeal fluid<sup>۲</sup> Necrozoospermia<sup>۳</sup> Astenospermia

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 به طوری 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.

آنتی‌اکسیدانت‌هایی نظیر ویتامین C، E و هاپپوتائورین به محیط کشت، نسبت تکوین بلاستوسیست در جنین‌های موش را بهبود می‌بخشد (۱۱،۴۴) و حضور آنتی‌اکسیدانت‌ها در محیط کشت موجب بهبود نسبت باروری و افزایش لانه‌گزینی 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 واسطه استرس اکسیداتیو رخ

## References:

1. pryor JL, Hughes F, Hales BF, Robaire B. Critical windows of exposure for children's health. *Environmental Health. Perspective suppl* 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 recipients 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 Moutassim S, Ménéz 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

- 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated apoptosis in human neuroblastoma cell line-SK-NMC. *J Chem 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, Shafl 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*. 2<sup>nd</sup> 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

- 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, Książczyzna D, et al. Effects of morin-5'-sulfonic acid sodium salt (NaMSA) on cyclophosphamide-induced changes in oxidoredox state in rat liver and kidney. *Hum Exp Toxicol* 2012;31(8):812-9.
36. Olek RA, Ziolkowski W, Wierzbna 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, Ceribaşı 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)



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

Fahmie Khan Mohammadi Ghane <sup>\*1</sup>, Abbas Ahmadi<sup>2</sup>, Easool Shahrooz<sup>3</sup>, Mazdak Razi<sup>4</sup>

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

### 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

<sup>1</sup> MSc in Histology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)

<sup>2</sup> Assistant Professor of Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>3</sup> Associate Professor of Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>4</sup> Assistant Professor of Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran