

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

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

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

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۲۱

### چکیده

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

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

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

**نتیجه‌گیری:** متعاقب این تحقیق مشخص شد که کروسین به‌علت خاصیت آنتی‌اکسیدانسی می‌تواند به‌طور قابل توجهی عوارض سوء بوسولفان را کاهش دهد.

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

## مقدمه

سرطان به‌عنوان یکی از علل اصلی مرگ و میر در جهان به‌شمار می‌رود. شیمی‌درمانی روش متداول درمان سرطان می‌باشد. بوسولفان از جمله داروهای شیمی‌درمانی بوده که به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد. این دارو دارای اثرات جانبی متعددی از جمله سمیت‌های تولید مثلی می‌باشد (۱).

بوسولفان عموماً جهت درمان لوسمی مزمن، سرطان تخمدان و همچنین قبل از عمل پیوند مغز استخوان در بیماران سرطانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. آسیب داروهای شیمی‌درمانی از جمله بوسولفان به DNA سلول منجر به القای پیری و در شرایطی آپوپتوزیس می‌شود. این دارو توانایی القای آپوپتوزیس را در سلول‌های زیبا دارد. بوسولفان از گروه داروهای آلکیل‌کننده بوده و یک دی‌متان سولفونات می‌باشد (۲). همچنین بوسولفان از داروهای سیتوتوکسیک نیز بوده و وقتی هیدرولیز می‌شود گروه‌های متان سولفونات آزاد کرده و این متان سولفونات نهایتاً به اسید متان سولفونیک و تتراهیدروفوران تبدیل شده که باعث آلکیل‌شدن DNA شده و از همانند سازی DNA و ترجمه RNA ممانعت می‌کند (۳). آلکیل‌شدن باعث Cross Linking در DNA نیز شده و در نهایت از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری کرده و باعث آپوپتوزیس سلول‌ها از طریق مسیر P53 می‌گردد (۴).

عدم تعادل بین آنتی‌اکسیدانت‌ها و اکسیدانت‌ها باعث ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود (۵، ۶) که برای کاهش اثرات استرس اکسیداتیو بایستی از آنتی‌اکسیدانت‌ها استفاده کرد (۷). در سال‌های اخیر تحقیقات نشان داده که نمونه‌های گیاهی می‌توانند به‌عنوان داروهای موثری به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت مناسب مورد استفاده قرار بگیرند (۸، ۹).

کلاله گل زعفران (*Crocus sativus*) شامل مواد شیمیایی متنوعی می‌باشد (۱۰). کروسین موجود در زعفران به‌عنوان کاروتنوئید گلیکوزیده با تاثیر متنوع فارماکولوژیکی می‌باشد (۱۱) که از جمله این تاثیرات می‌توان حفاظت سلول‌های عضله قلبی در آسیب‌های هیپوکسی (۱۲) و خاصیت حفاظتی آنتی‌اکسیدانتی روی سلول‌های سرطانی (۱۳، ۱۴) و خاصیت ضدافسردگی (۱۵، ۱۶) و خاصیت ضدالتهابی (۱۷) را نام برد. مطالعات نشان داده کروسین دارای ترکیبات کاروتنوئید، مونوترپن آلدئید، پیکروکروسین و سافرانال می‌باشد (۱۸).

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

## مواد و روش‌ها

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

موش‌ها به‌طور تصادفی به ۶ گروه ۵ تایی تقسیم شدند:

گروه کنترل سالم، حلال BSF (بوسولفان) را به‌مقدار ۵۰ درصد DMSO و ۵۰ درصد PBS با حجم ۰/۱ میلی‌لیتر به‌صورت داخل صفاقی (IP) تک دوز و گروه بوسولفان، فقط بوسولفان با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داخل صفاقی، تک‌دوز به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر دریافت کردند (۱۹).

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

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

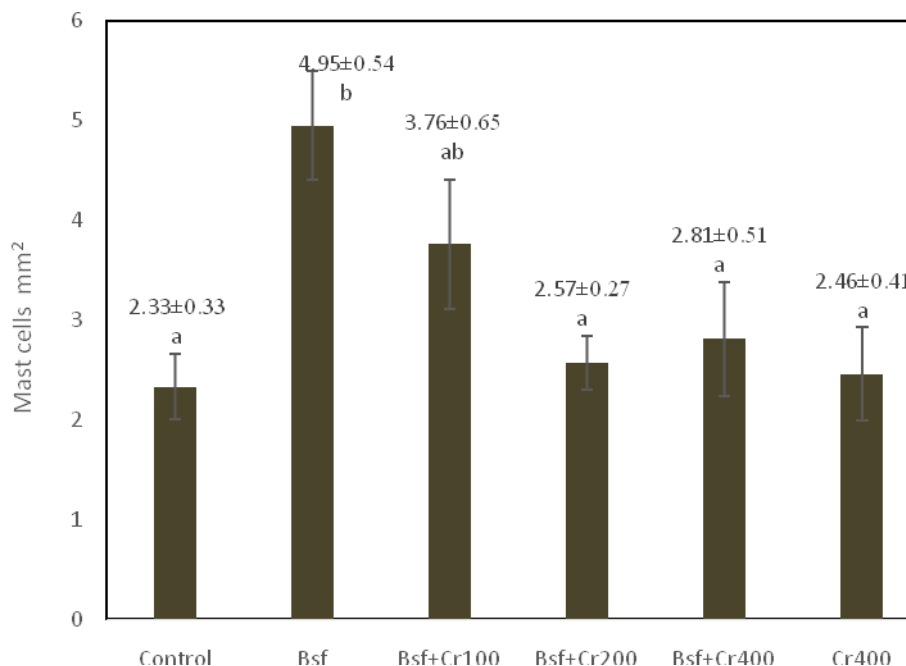
تخمدان راست موش‌ها نیز جهت ارزیابی مالون‌دی‌آلدئید (Malondialdehyde) خارج شده و به‌همراه سرم‌ها در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا روز انجام آزمایشات قرار گرفتند. MDA شاخص پراکسیداسیون لیپیدی بوده و جهت تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدی، مقدار تولید MDA در بافت تخمدان با استفاده از روش واکنش تیوباربیتوریک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

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

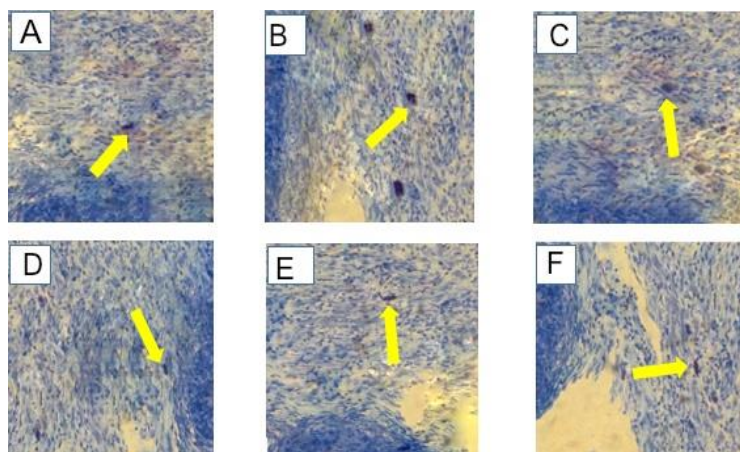
رنگ ارغوانی توسط SOD مهار می‌شود و با سنجش تغییر رنگ ایجاد شده در طول موج ۵۶۰ نانومتر فعالیت SOD برحسب درصد مهار تولید NBTH2 اندازه‌گیری شده و میزان این واکنش بر اساس میلی‌مول در دقیقه بیان می‌شود (۲۲). داده‌های حاصله با استفاده از نرم افزار SPSS (Version 16.00, USA) و روش آماری ANOVA یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی Tukey مورد مقایسه آماری قرار گرفتند و اختلاف بین گروه‌ها در سطح  $p < 0.05$  معنی‌دار توصیف شد و تمامی داده‌ها با میانگین و معیار خطا نشان داده شدند.

## نتایج

در این مطالعه میانگین تعداد ماست سل‌ها در تخمدان چپ گروه‌های آزمایشی مورد ارزیابی قرارگرفت و نتایج نشان داد که میانگین تعداد ماست سل‌ها در گروه‌های دریافت‌کننده بوسولفان به‌همراه کروسین ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه نسبت به گروه دریافت‌کننده بوسولفان کاهش داشت و این کاهش دارای اختلاف معنی‌داری بود ( $p = 0.034$  و  $p = 0.024$ )، و در گروه دریافت‌کننده بوسولفان به‌همراه کروسین ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه هم کاهش نشان داد که این کاهش فاقد اختلاف آماری معنی‌داری بود ( $p = 0.504$ ). ارزیابی‌های آماری مشخص کرد که میانگین تعداد ماست سل‌ها در گروه‌های دریافت‌کننده بوسولفان به‌همراه کروسین ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه نسبت به گروه کنترل افزایش داشت که این افزایش فاقد اختلاف معنی‌داری بود ( $p = 0.314$  و  $p = 0.999$  و  $p = 0.977$ ). در گروه دریافت‌کننده کروسین ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه نیز نسبت به گروه کنترل اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد ( $P = 1/0$ ) (نمودار ۱)، (شکل ۱).

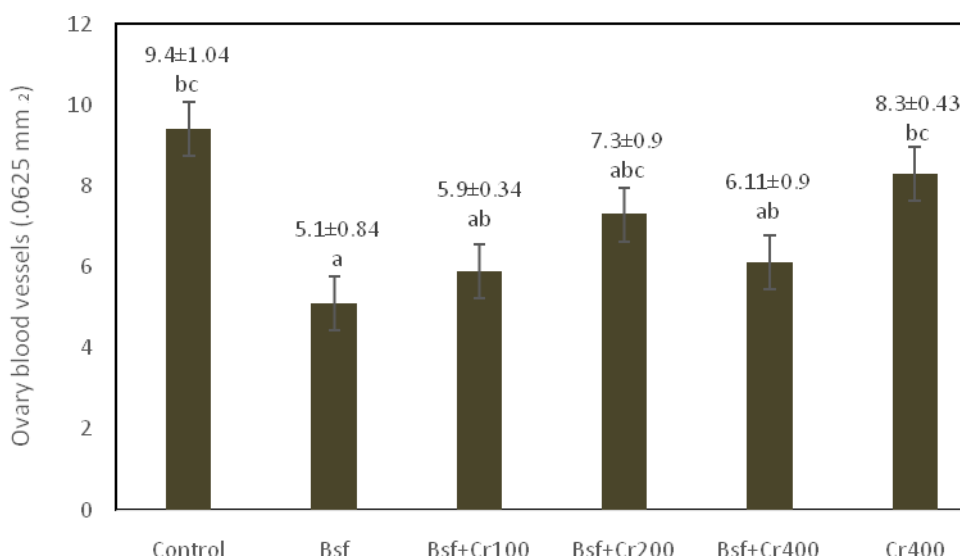


نمودار ۱: مقایسه میانگین تعداد ماست سل‌ها در تخمدان چپ گروه‌های مختلف آزمایشی (روش آماری ANOVA یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی Tukey) حروف نامشابه نمایان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  می‌باشند.

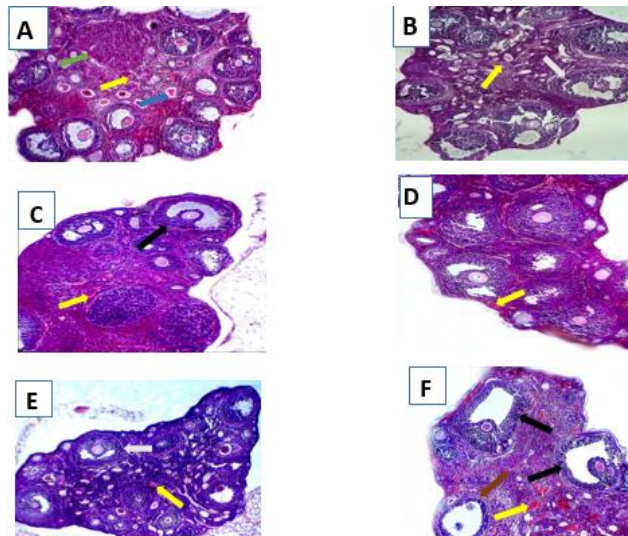


شکل ۱: برش عرضی تخمدان چپ در گروه کنترل (A)، گروه بوسولفان به همراه کرومین ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه (C)، گروه بوسولفان به همراه کرومین ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه (D)، گروه بوسولفان به همراه کرومین ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه (E)، گروه کرومین ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه (F)، که پیکان‌های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

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

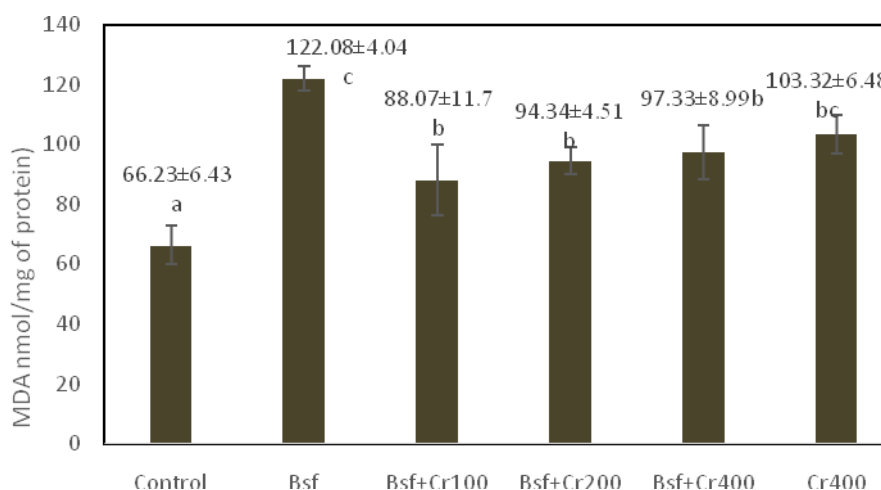


نمودار ۲: مقایسه میانگین تعداد عروق خونی تخمدان چپ در گروه‌های آزمایشی (روش آماری ANOVA یک طرفه و تست تعقیبی توکی (Tukey) حروف نامشابه نمایان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0/05$  می‌باشند.



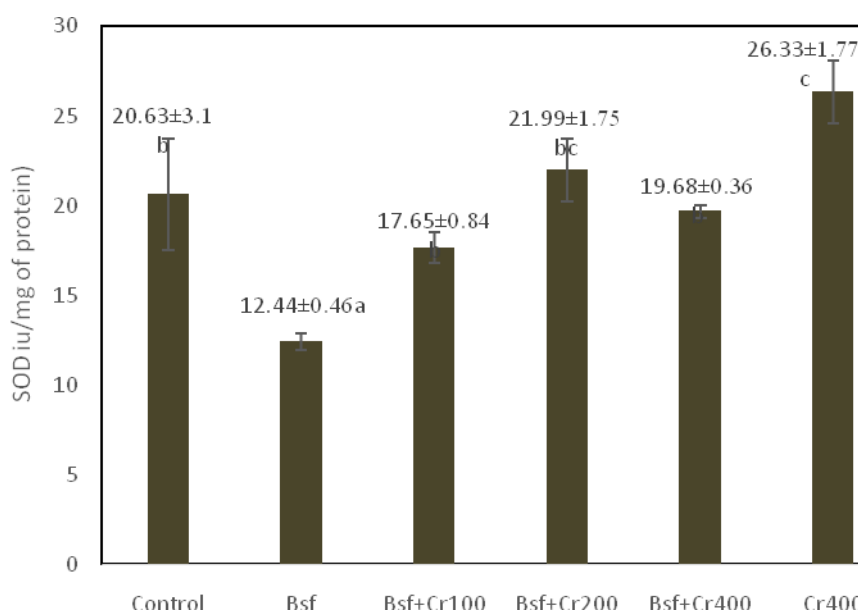
شکل ۲: برش عرضی تخمدان چپ در گروه کنترل (A)، گروه بوسولفان (B)، گروه بوسولفان به همراه کروسین ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه (C)، گروه بوسولفان به همراه کروسین ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه (D)، گروه بوسولفان به همراه کروسین ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه (E)، گروه کروسین ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه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

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



نمودار ۳: مقایسه میانگین غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) تخمدان راست در گروه‌های مختلف آزمایشی (روش آماری ANOVA یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی (Tukey) حروف نامشابه نمایان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0/05$  می‌باشند.

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



نمودار ۴: مقایسه میانگین غلظت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) سرم در گروه های مختلف آزمایشی (روش آماری ANOVA یک طرفه و تست تعقیبی توکی (Tukey) حروف نامشابه نمایان گر اختلاف معنی دار در سطح  $p < 0/05$  می باشد.

### بحث

مطالعه حاضر نشان داد که میانگین تعداد ماست سل ها به عنوان سلول های پیش التهابی در بافت تخمدان گروه دریافت کننده Bsf به طور معنی دار نسبت به گروه های کنترل و دریافت کننده Bsf+Cr به خصوص کروسین با دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن افزایش معنی دار نشان داد. این یافته نشان دهنده اثر التهابی Bsf بر بافت تخمدان بوده و کروسین دارای اثر محافظتی قابل ملاحظه ای می باشد. در همین راستا بررسی میزان MDA به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو در بافت تخمدان نشان داد که در گروه Bsf نسبت به گروه های درمان شده با کروسین به طور معنی دار بیشتر بوده و این یافته نیز اثر محافظتی کروسین را در برابر Bsf به اثبات می رساند. همچنین بررسی میزان آنزیم SOD به عنوان عامل دفاع سلولی در برابر رادیکال های آزاد (۲۳) در سرم خون گروه های درمان شده با کروسین نسبت به گروه Bsf افزایش معنی دار نشان داد، که این یافته نیز حاکی از وجود اثر محافظتی کروسین بر روی بافت تخمدان می باشد. به طور کلی نشان داده شده است که گونه های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species) در سلول می توانند باعث اختلال در عملکرد

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

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

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

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



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

با توجه به این که استرس اکسیداتیو در نتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال های آزاد و گونه های فعال اکسیژن از قبیل آنیون سوپراکسید، رادیکال آزاد هیدروکسیل، هیدروژن پراکسید از یک طرف و تضعیف سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی از طرف دیگر ایجاد می شود، بنابراین استرس اکسیداتیو باعث ایجاد اثرات مخرب روی ماکرومولکول ها از جمله DNA، پروتئین ها و لیپیدها می گردد (۴۰). در سیستم های بیولوژیکی هوازی برای مقابله با رادیکال های آزاد و گونه های فعال اکسیژن، مکانیسم های دفاعی طراحی شده است تا اثرات زیان بار این عوامل مهاجم را خنثی نموده یا به حداقل برسانند. برخی از اجزای سیستم دفاعی شامل آنزیم ها مانند سوپراکسید دیسموتاز، گلووتاتیون پراکسیداز، کاتالازها هستند که در داخل بدن سنتز می شوند، ولی برخی دیگر از اجزای این سیستم مانند ویتامین E، بتاکاروتن باید از طریق رژیم غذایی تامین شوند (۴۱). آنتی اکسیدانت های آنزیمی و غیر آنزیمی سیستم های اصلی دفاعی بدن در برابر آسیب های ناشی از رادیکال های آزاد هستند (۴۲). خصوصیت مهم این آنزیم ها، قابل القا بودن آنها تحت شرایط استرس اکسیداتیو است (۴۳). آنیون سوپراکسید اولین رادیکال آزاد مشتق از اکسیژن است که به وسیله SOD به اکسیژن و پراکسید هیدروژن خنثی می شود. آنزیم های کاتالاز (Catalase) و گلووتاتیون پراکسیداز (Glutatione Peroxidase) موجب تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می شوند (۴۴). مجموعه آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز به علت اثرات مهاری بر تشکیل رادیکال های اکسیژن اولین خط دفاعی سلول در برابر مسمومیت ناشی از رادیکال های آزاد هستند و مواجهه سلول با استرس اکسیداتیو منجر به القای آنها می شود (۴۵، ۴۶). در مطالعه حاضر مشخص شد که کروسین به دلیل دارا بودن خواص آنتی اکسیدانتی و خنثی سازی رادیکال های آزاد و از دسترس خارج کردن آنها برای واکنش های اکسیداتیو، از خواص اکسیداتیو بوسولفان می کاهد و آنزیم SOD که وظیفه جمع آوری یون سوپراکسید افزایش یافته توسط بوسولفان و خنثی سازی آن را به عهده دارد، با مصرف کروسین افزایش می یابد. همچنین مطالعه حاضر نشان داد که میانگین تعداد ماست سل ها در بافت تخمدان به عنوان یکی از سلول های شاخص التهاب بافتی، با استفاده از کروسین در شرایط استرس اکسیداتیو کاهش می یابند، ولی جهت اثبات کامل این موضوع مطالعه سایر سلول های التهابی مانند، انواع لکوسیت ها و عوامل بیوشیمیایی مربوطه همانند، عوامل استرس نیتروژاتیو در بافت تخمدان مورد لزوم می باشد.

### نتیجه گیری

در نتیجه گیری نهایی از این مطالعه می توان اظهار نمود که با به کارگیری کروسین همراه بوسولفان می توان اثرات مخرب بوسولفان در بدن را کاهش داد و نتایج حاصل از شیمی درمانی را بهبود بخشید که این می تواند با خاصیت از بین برندگی رادیکال های آزاد و کاهش استرس اکسیداتیو توسط کروسین که یک آنتی اکسیدانت می باشد، قابل توجیه باشد. لذا طراحی کارآزمایی های بالینی به منظور استفاده همزمان کروسین با بوسولفان در شیمی درمانی توصیه می شود تا از این طریق بتوان در جهت تولید داروهای مکمل به منظور کاهش عوارض ناشی از داروهای ضدسرطانی قدمی مثبت برداشته شود.

### تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان نامه دکترای تخصصی بافت شناسی مقایسه ای به شماره ثبت ۶-۱۸۳۰-۶۴۰ استخراج شده و با مساعدت های کارکنان آزمایشگاه بافت شناسی و جنین شناسی و معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به انجام رسیده است که از ایشان صمیمانه تقدیر و تشکر می شود.

## منابع

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

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

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

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

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

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

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

Received: 11.Jun. 2019

Accepted: 5 Jul. 2020

### Abstract

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

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

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

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

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