

Original article

Protective Effect of Oleuropein on 5-Fluorouracil-Induced Ovarian Damage

Mahshid Khajavi¹, Elham Safarzadeh^{*2}, Faraz Mahdizadeh¹, Shokofeh Banaei^{*3}

1. Students Research Committee, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

2. Department of Microbiology, Parasitology and Immunology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

3. Department of Physiology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

***Corresponding authors.** Tel: +984533534692, Fax: +984533534703, E-mail: s.banaei@arums.ac.ir

E-mail: e.safarzadeh@arums.ac.ir

Article info

Article history:

Received: Dec 25, 2024

Accepted: Mar 4, 2025

Keywords:

Estradiol

Progesterone

Fluorouracil

Oleuropein

Ovary

ABSTRACT

Background: 5-fluorouracil is one of the chemotherapy drugs that has destructive effects on body tissues such as the heart, liver, kidney, brain and reproductive system in humans and animals. Reproductive dysfunction is considered to be an important side effect of chemotherapy drugs such as 5-fluorouracil (5-FU). This study was designed to assess the effects of Oleuropein (OLE) against 5-FU-induced ovarian toxicity.

Methods: 24 adult female rats (weighing 200-225 g) were randomly divided into 4 groups (N= 6) with a treatment period of 14 days including the control group, 5-FU (100 mg/kg/week, IP), OLE (200 mg/kg/day, IP), 5-FU + OLE group, administrated 5-FU (100 mg/kg/week) with OLE (200 mg/kg/day). After treatment, blood samples were collected for the measurement of female sexual hormones, and ovarian samples were taken for histological assessment.

Results: 5-FU significantly decreased female sexual hormones. Also, it caused tissue damage in the ovary, as 5-FU-administered rats had degenerated follicles and hemorrhage. While the administration of OLE significantly increased the estradiol, and progesterone ($p < 0.05$) levels and improved ovarian pathological changes.

Conclusion: Oleuropein reduces 5-fluorouracil –induced reproductive toxicity in female rats.

How to cite this article: Khajavi M, Safarzadeh E, Mahdizadeh F, Banaei Sh. Protective Effect of Oleuropein on 5-Fluorouracil-Induced Ovarian Damage. J Ardabil Univ Med Sci. 2025;24(4):433-444.

Extended Abstract

Background: With the increasing incidence of cancer, it is crucial to reduce the long-term side effects that patients experience after treatment. For women, the consequences of chemotherapy-induced damage to the reproductive system include infertility and premature menopause, which negatively affect cognition, mood, cardiovascular, bone, hormone secretion, sexual health, and increase the risk of premature mortality. These long-term effects affect the patient's quality of life. However, the precise mechanisms by which chemotherapeutic agents cause ovarian damage, primordial follicle depletion, and decreased sex hormone secretion are still unclear. Therefore, the development of effective pharmacological approaches to preserve fertility, prevent infertility, and improve quality of life after chemotherapy is important. Antimetabolites refer to a wide range of drugs that disrupt essential biosynthetic processes or become part of macromolecules such as DNA and RNA, thereby disrupting cell function.

5-Fluorouracil (5-FU) is an antimetabolite that specifically targets uracil metabolism. It is commonly used to treat solid tumors in the digestive system, especially some of the most deadly types such as colorectal cancer and pancreatic ductal adenocarcinoma, as well as other types of cancer that arise in organs such as the breast and cervix. 5-FU works by converting uracil to 5-fluoro-2'-deoxyuridine monophosphate, which prevents the production of the enzyme thymidylate synthase. This enzyme is crucial for tumor growth because it helps synthesize thymine and its expression is cell cycle dependent. By reducing the amount of the thymidylate synthase enzyme, the level of 2'-deoxythymidine-5'-monophosphate (dTMP) - which is essential for DNA repair and replication - is also reduced, which can lead to cellular dysfunction. Exposure to 5-FU increases the production of free radicals in the body and an imbalance between free radicals and the antioxidant defense system, leads to tissue damage. The use of chemotherapy

drugs such as 5-FU reduces the production and secretion of the sex hormones estrogen, progesterone, and testosterone, resulting in infertility.

Oleuropein (OLE) is a polyphenol extracted from various parts of the olive tree, including the fruit and leaves. OLE has been shown to have cardioprotective, anti-inflammatory, antioxidant, anti-diabetic, and anti-cancer properties. These findings make it a natural extract that can be considered in treatment plans for various disorders. This study aimed to investigate the protective effects of OLE on 5-FU-induced ovarian toxicity in female rat.

Methods: In the present study, 24 adult female Sprague-Dawley rats (weighing 200–225 g) were randomly divided into 4 groups of 6 rats each. The animals had free access to standard food and water throughout the study period and were maintained at a controlled temperature (21°C) and humidity (60%) with a 12-h light-dark cycle. Female rats were divided into 4 groups (N=6) with a 14-day treatment period. The groups were as follows: 1. Control group (0.4 ml normal saline intraperitoneally per day), 2. 5-FU group (100 mg/kg/week intraperitoneally), 3. OLE group (200 mg/kg/day intraperitoneally), 4. 5-FU and OLE group (100 mg/kg/week 5-FU plus 200 mg/kg/day OLE). At the end of the treatment period, the rats were anesthetized with 50 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine, and then blood samples and fresh ovarian tissues were collected. Blood samples were centrifuged at 3000 rpm for ten minutes. Serum estradiol and progesterone levels were measured. To examine the histopathological changes in the ovary, after fixing the tissue in 10% formalin, the tissue was processed and embedded in paraffin blocks. Then, 5-µm sections were prepared and placed on slides. Finally, the samples were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E). It should be noted that the prepared slides were examined and analyzed by a pathologist in a blinded manner under a light microscope at 40x magnification, and at least 10 fields in each ovarian section were evaluated. Histological alterations were scored on a four -point scale:

(–) none, (+) mild, (++) moderate, and (+++) severe damage. The results were expressed as mean $\pm$ standard error. The obtained data were statistically analyzed using One Way ANOVA with Graph Pad Prism software version 8.4.3. Tukey post hoc test was performed to determine the significant difference between groups. Also, a P-value less than 0.05 were considered significant.

Results: Administration of 5-FU significantly decreased serum estradiol levels, while administration of OLE significantly increased serum estradiol levels. Administration of 5-FU also decreased serum progesterone levels, while administration of OLE significantly increased serum progesterone levels ($p < 0.05$). No changes were observed in the control group in ovarian histological examinations. In the 5-FU group, the normal structure of the ovarian tissue was destroyed. Compared with the control group, bleeding accompanied by destruction of ovarian follicles (follicular atresia) was observed following treatment with 5-FU. Treatment with OLE resulted in a

significant reduction in bleeding and destruction of ovarian follicles in the ovarian tissue.

Conclusion: The results of the present study showed that co-administration of OLE can partially reduce the toxic effects of 5-FU on the ovaries and increase the levels of estradiol and progesterone. Therefore, it seems that OLE can be used as a natural compound to prevent ovarian damage. In our study, treatment with 5-FU caused pathological changes in ovarian tissue, including destruction of ovarian follicles (follicular atresia) and hemorrhage. It seems that the high oxidative stress power of 5-FU is the main reason for these disorders. In the present study, we found that OLE reduces the morphological changes in ovarian tissue. These protective effects of OLE may be due to the strong anti-apoptotic, anti-inflammatory, and antioxidant properties of this drug, which were confirmed by the reduction of pathological changes in ovarian tissue.

اثر حفاظتی اولئوروپین بر آسیب تخمدان ناشی از ۵-فلوئورووراسیل

مهشید خواجهی^۱، الهام صفرزاده^{۲*}، فراز مهدیزاده^۱، شکوفه بنائی^{۳*}

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۲. گروه میکروب شناسی، انکلسناسی و ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

* نویسندگان مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۳۵۳۴۶۹۲ فاکس: ۰۴۵۳۳۵۳۴۷۰۳ پست الکترونیک: s.banaei@arums.ac.ir
e.safarzadeh@arums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: ۵-فلوئورووراسیل یکی از داروهای شیمی‌درمانی است که اثرات مخربی روی بافت‌های بدن از قبیل قلب، کبد، کلیه، مغز و دستگاه تولید مثل در انسان و حیوانات دارد. اختلال عملکرد تولیدمثلی یک عارضه جانبی مهم داروهای شیمی‌درمانی از قبیل ۵-فلوئورووراسیل در نظر گرفته می‌شود. این مطالعه جهت بررسی اثرات اولئوروپین در مقابل سمیت تخمدانی ناشی از ۵-فلوئورووراسیل طراحی شد.

روش کار: ۲۴ موش صحرایی ماده بالغ (به وزن ۲۰۰ تا ۲۲۵ گرم) بطور تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. با دوره درمان ۱۴ روزه شامل گروه کنترل، گروه ۵-فلوئورووراسیل (تیمار با دوز ۱۰۰ mg/kg یک بار در هفته با تزریق داخل صفاقی)، گروه اولئوروپین (۲۰۰ mg/kg روزانه با تزریق داخل صفاقی) و گروه دریافت کننده داروی ۵-فلوئورووراسیل و اولئوروپین. بعد از درمان، نمونه‌های خون برای اندازه‌گیری هورمون‌های جنسی زنانه جمع‌آوری شدند و نمونه‌های تخمدان برای بررسی بافت شناسی برداشته شدند.

یافته‌ها: ۵-فلوئورووراسیل، سطح سرمی هورمون‌های جنسی زنانه (استرادیول و پروژسترون) را بطور معنی‌داری کاهش داد. همچنین باعث آسیب بافت تخمدان شد بطوریکه در موش‌های صحرایی دریافت کننده ۵-فلوئورووراسیل تخریب فولیکول‌های تخمدان (آترزی فولیکولی) و خونریزی وجود داشت. در حالیکه درمان با اولئوروپین بطور معنی‌دار سطح استرادیول و پروژسترون ($p < 0.05$) را افزایش داد و تغییرات پاتولوژیک تخمدان‌ها را بهبود بخشید.

نتیجه‌گیری: اولئوروپین سمیت تولیدمثلی ناشی از درمان با ۵-فلوئورووراسیل را در موش‌های صحرایی ماده را کاهش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: استرادیول، پروژسترون، فلوئورووراسیل، اولئوروپین، تخمدان

دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۵ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۱۴

مقدمه

تولیدمثل یکی از اولویت‌های اصلی سازمان بهداشت جهانی و اساس بقای انسان است. عوامل زیادی می‌توانند قدرت تولیدمثل را کاهش داده یا کاملاً از

بین برد و باعث ناباروری در زوج‌ها شوند. قرار گرفتن در معرض عواملی مانند سموم و آلاینده‌های محیطی، داروهای شیمی‌درمانی مانند سیکلوفسفامید و ۵-فلوئورووراسیل باعث افزایش تولید رادیکال‌های

آزاد در بدن و عدم تعادل بین رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود. استفاده از داروهای شیمی‌درمانی باعث کاهش تولید و ترشح هورمون‌های جنسی استروژن، پروژسترون و تستوسترون شده و در نتیجه منجر به نازایی می‌شوند [۱]. تجویز داروهای شیمی‌درمانی می‌تواند تعادل ردوکس را در بافت‌ها برهم زده و باعث ایجاد اختلالات فیزیولوژیکی و بیولوژیکی اندام‌های بدن شوند. استرس اکسیداتیو در بافت‌های بدن از جمله تخمدان و بیضه باعث کاهش آنتی‌اکسیدان‌های بافتی می‌شود. تحقیقات نشان می‌دهند که افزایش ناباروری در مردان و زنان ارتباط تنگاتنگی با کاهش مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها دارند [۲].

آنتی‌متابولیت‌ها به طیف وسیعی از داروهای اطلاق می‌شود که فرآیندهای بیوسنتزی ضروری را مختل می‌کنند یا بخشی از ماکرومولکول‌هایی مانند DNA و RNA می‌شوند و در نتیجه عملکرد سلول را مختل می‌کنند. ۵-فلوئورواوراسیل یک آنتی‌متابولیت است که به‌طور خاص متابولیسم اوراسیل را هدف قرار می‌دهد. ۵-فلوئورواوراسیل در دهه ۱۹۵۰ توسعه یافت و از آن زمان به‌طور گسترده به‌عنوان جزئی از رژیم‌های شیمی‌درمانی استفاده می‌شود [۴،۳]. این دارو معمولاً برای درمان تومورهای جامد در سیستم گوارشی به‌ویژه برخی از کشنده‌ترین انواع مانند سرطان کولورکتال و آدنوکارسینوم مجرای پانکراس و همچنین انواع دیگر سرطان‌هایی که در اندام‌هایی مانند سینه و دهانه رحم ایجاد می‌شوند، استفاده می‌شود [۵].

داروی ۵-فلوئورواوراسیل^۱ با تبدیل اوراسیل به مونوفسفات ۵-fluoro-2'-deoxyuridine که از تولید آنزیم تیمیدیلات سنتاز جلوگیری می‌کند، عمل می‌کند. این آنزیم برای رشد تومور بسیار مهم است زیرا به سنتز تیمین کمک می‌کند و بیان آن به چرخه

سلولی بستگی دارد. با کاهش مقدار آنزیم تیمیدیلات سنتاز، سطح ۵'-deoxythymidine (dTMP) - که برای ترمیم و تکثیر DNA ضروری است نیز کاهش می‌یابد که می‌تواند منجر به اختلال عملکرد سلولی شود [۶].

شیمی‌درمانی در درمان سرطان و افزایش بقای بیماران مؤثر شناخته شده است. با این حال، عملکرد غیر هدفمند آن می‌تواند منجر به عوارض جانبی تهدیدکننده زندگی بر روی اندام‌های سالم شود که اغلب منجر به قطع درمان می‌شود [۷]. مانند بسیاری از داروهای شیمی‌درمانی دیگر، ۵-فلوئورواوراسیل نیز می‌تواند اثرات سمی مانند سمیت اندام‌های تولیدمثلی، سمیت گوارشی و سمیت قلبی داشته باشد [۹،۸]. ۵-فلوئورواوراسیل همچنین در سلول‌های کبدی — a-fluoro-b-alanine، اوره، دی‌هیدرواوراسیل، آمونیاک و دی‌اکسید کربن تجزیه می‌شود که منجر به سمیت کلیوی و کبدی می‌شود [۹]. به دلیل افزایش تمایل به استفاده از محصولات طبیعی، چندین مطالعه بر روی استفاده از محصولات طبیعی برای مقابله با اثرات سمی ۵-فلوئورواوراسیل طراحی شده‌اند [۱۰-۱۳]. اولئوروپین^۲ پلی‌فنلی است که از قسمت‌های مختلف درخت زیتون از جمله میوه و برگ استخراج می‌شود [۱۴،۱۵]. فواید سلامتی برگ زیتون و ترکیبات آن از جمله اولئوروپین به‌طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است و مشخص شده است که اولئوروپین اثرات مثبت متعددی بر سلامتی دارد. نشان داده شده است که اولئوروپین دارای خواص محافظت‌کننده قلبی، ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضد دیابت و ضد سرطان است. این یافته‌ها آن را به عصاره‌ای طبیعی تبدیل می‌کند که می‌تواند در برنامه‌های درمانی برای انواع اختلالات در نظر گرفته شود [۱۶-۱۸].

^۲ Oleuropein, OLE

^۱ 5-FU, 5-Fluorouracil

بر اساس اطلاعات داده شده، به نظر می‌رسد که اولئوروپین می‌تواند به کاهش نازائی و سمیت‌های ناشی از ۵-فلوئوروووراسیل کمک کند. این مطالعه با هدف بررسی اثرات محافظتی اولئوروپین بر روی سمیت ناشی از ۵-فلوئوروووراسیل بر روی تخمدان‌ها در موش‌های ماده انجام شد.

روش کار

این مطالعه آزمایشگاهی با کد اخلاق IR.ARUMS.AEC.1403.017 بر روی حیوانات آزمایشگاهی موش صحرایی ماده که از دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج) تهیه شده بودند، انجام شد. هدف این مطالعه بررسی تأثیر اولئوروپین بر بافت تخمدان در موش‌های ماده تیمار شده با ۵-فلوئوروووراسیل بود.

در مطالعه حاضر، ۲۴ موش صحرایی ماده بالغ نژاد Sprague-Dawley (به وزن ۲۰۰ تا ۲۲۵ گرم) به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی در هر گروه تقسیم شدند. حیوانات در طول دوره مطالعه دسترسی آزاد به غذا و آب استاندارد داشتند و در دمای کنترل شده (۲۱ درجه سانتی گراد) و رطوبت (۶۰ درصد) با ۱۲ ساعت چرخه نور و تاریکی نگهداری شدند.

گروه‌های آزمایشی

موش‌های صحرایی ماده به ۴ گروه (N=6) با دوره درمان ۱۴ روزه تقسیم شدند. گروه‌ها به شرح زیر بود:

۱. گروه کنترل فقط نرمال سالین دریافت کردند (۰/۴ میلی‌لیتر در روز، تزریق به‌صورت داخل صفاقی)
۲. گروه ۵-فلوئوروووراسیل (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در هفته، تزریق به‌صورت داخل صفاقی)
۳. گروه اولئوروپین (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز، تزریق به‌صورت داخل صفاقی)
۴. گروه ۵-فلوئوروووراسیل و اولئوروپین (5-FU+OLE)، تجویز ۵-فلوئوروووراسیل (۱۰۰

میلی‌گرم بر کیلوگرم در هفته) با اولئوروپین (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز) ۵-فلوئوروووراسیل (Sigma-Aldrich) در نرمال سالین زیر هود حل شد و با تزریق داخل صفاقی به‌صورت هفتگی به مدت ۱۴ روز (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) دریافت شد [۱۳]. پودر اولئوروپین از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد و در نرمال سالین حل شد و به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه تزریق شد [۱۹].

اندازه‌گیری هورمون‌های استرادیول و پروژسترون

در پایان دوره درمان، موش‌ها با ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کتامین و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم زایلازین، تزریق داخل صفاقی بیهوش شدند، سپس نمونه‌های خون و بافت‌های تازه تخمدان جمع‌آوری شد. نمونه‌های خون با سرعت ۳۰۰۰ rpm به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شدند. سطوح استرادیول و پروژسترون در سرم با استفاده از کیت‌های سنجش رندوکس^۱ اندازه‌گیری شد.

مطالعه هیستوپاتولوژیک

برای بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک تخمدان، پس از تثبیت بافت در فرمالین ۱۰ درصد، پردازش بافت انجام شد و در بلوک‌های پارافین جاسازی شد. سپس مقاطع ۵ میکرومتری تهیه و روی اسلایدها قرار گرفت. در نهایت نمونه‌ها با روش هماتوکسیلین-ئوزین (Hematoxylin and Eosin, H&E) رنگ‌آمیزی شدند. درجه‌بندی تغییرات بافتی به‌صورت زیر انجام گردید: (-) صفر، (+) درجه خفیف، (++) درجه متوسط و (+++) درجه شدید تغییرات [۲]. لازم به ذکر است که لام‌های آماده‌شده توسط یک پاتولوژیست به روش کور زیر میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۴۰ مورد بررسی و تحلیل قرار گرفت و حداقل ۱۰ فیلد در هر برش تخمدانی مورد ارزیابی قرار گرفت.

¹ Randox

تحلیل آماری

نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار بیان شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه^۱ با نرم افزار Graph Pad Prism ۸،۴،۳ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. آزمون تعقیبی توکی^۲ برای تعیین تفاوت معنی داری بین گروه‌ها انجام شد. همچنین p -value کمتر از ۰/۰۵ سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

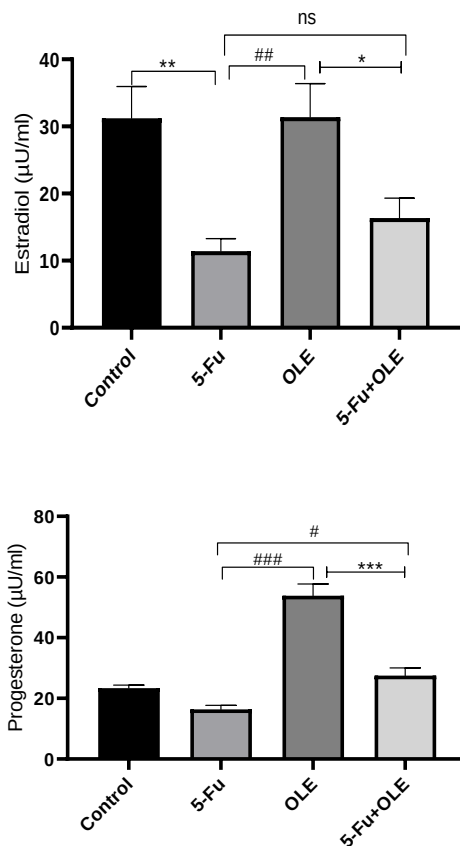
یافته‌ها

در مطالعه حاضر، اثرات محافظتی و درمانی اولئوروپین در برابر سمیت تولیدمثلی ناشی از ۵-فلوئورواوراسیل مورد بررسی قرار گرفت.

اثر اولئوروپین و ۵-فلوئورواوراسیل بر سطح سرمی هورمون‌های جنسی استرادیول و پروژسترون

همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است، تجویز ۵-فلوئورواوراسیل باعث کاهش معنی داری در سطح سرمی استرادیول شد در حالی که تجویز اولئوروپین سطح سرمی استرادیول را به‌طور قابل توجهی افزایش داد. همچنین تجویز ۵-فلوئورواوراسیل باعث کاهش سطح سرمی پروژسترون شد در حالی که تجویز اولئوروپین سطح سرمی آن را به‌طور معنی دار افزایش داد ($p < 0.05$). همچنین جدول ۱ مقادیر سطح سرمی استرادیول و

پروژسترون در گروه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد.



نمودار ۱. اثر ۵-فلوئورواوراسیل (5-Fu) و اولئوروپین (OLE) بر سطح سرمی استرادیول و پروژسترون.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ### $P < 0.001$, # $P < 0.05$, # $P < 0.01$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل، * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ در مقایسه با گروه اولئوروپین. نتایج آنالیز آماری به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار گزارش شده است (ns معنادار نیست).

¹ One Way ANOVA

² Tukey post hoc

جدول ۱. سطح سرمی استرادیول و پروژسترون در گروه‌های مورد مطالعه

گروه	کنترل	۵-فلوئورواوراسیل	اولئوروپین	اولئوروپین + ۵-فلوئورواوراسیل	
استرادیول	۳۱/۲۰ $\pm$ ۴/۷۵	۱۱/۴۲ $\pm$ ۱/۸۵	۳۱/۳۸ $\pm$ ۵/۰۱	۱۶/۳۴ $\pm$ ۲/۹۸	$P = 0.001$
پروژسترون	۲۳/۳۴ $\pm$ ۱/۰۱	۱۶/۴۰ $\pm$ ۱/۲۷	۵۳/۸۶ $\pm$ ۳/۸۶	۲۷/۴۸ $\pm$ ۲/۵۶	$P = 0.001$

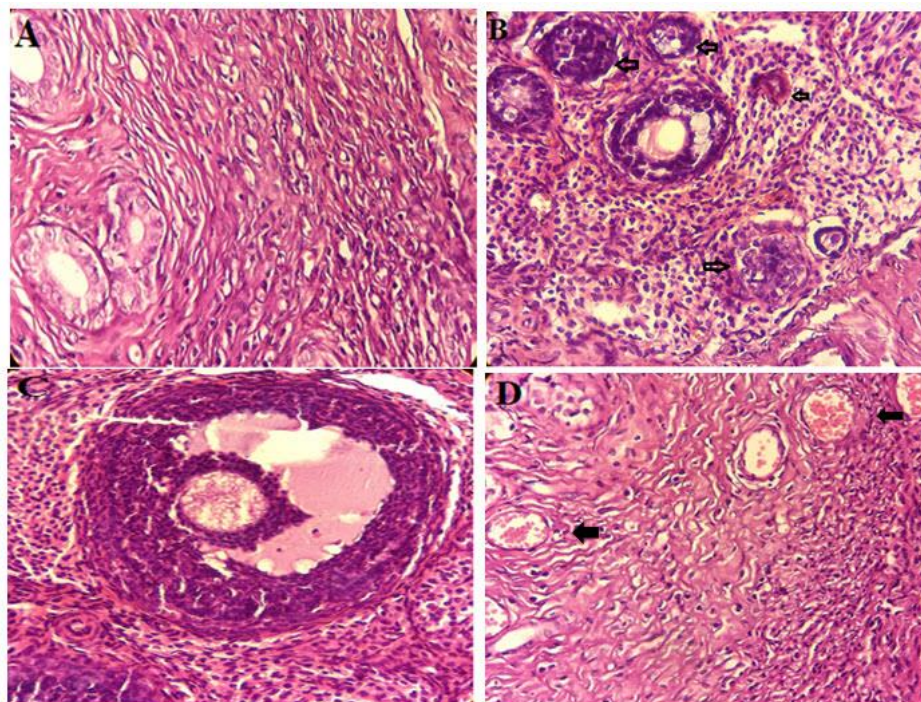
اعداد به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار گزارش شده است.

در بررسی‌های بافت‌شناسی تخمدان هیچ تغییری در گروه کنترل مشاهده نشد. در گروه ۵-فلوئورواوراسیل ساختار طبیعی بافت تخمدان تخریب

اثر اولئوروپین بر تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از ۵-فلوئورواوراسیل

گردیده بود. به طوری که در مقایسه با گروه کنترل، خونریزی همراه با تخریب فولیکول‌های تخمدان (آترزی فولیکولی) به دنبال درمان با ۵-فلوئورواوراسیل مشاهده شد (شکل ۱).
درمان با اولئوروپین منجر به کاهش قابل توجه خونریزی و تخریب فولیکول‌های تخمدان در بافت تخمدان شد. بنابراین، به نظر می‌رسد که درمان با اولئوروپین باعث بهبود اثرات تخریبی ناشی از ۵-فلوئورواوراسیل می‌شود (شکل ۱).

همچنین نتایج ارزیابی هیستوپاتولوژیک در گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است. طبق جدول، درجه شدید تخریب فولیکول‌های تخمدان (آترزی فولیکولی) و خونریزی در گروه دریافت کننده ۵-فلوئورواوراسیل قابل مشاهده است. در گروه درمان با اولئوروپین و ۵-فلوئورواوراسیل درجه‌ای از خونریزی دیده می‌شود.



شکل ۱. ارزیابی هیستوپاتولوژیک تخمدان‌ها پس از درمان با ۵-فلوئورواوراسیل و اولئوروپین

رنگ آمیزی مقاطع تخمدان با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) انجام شده است، (A) ساختار طبیعی تخمدان در گروه کنترل، (B) تخریب فولیکول‌های تخمدان (آترزی فولیکولی) و خونریزی در گروه دریافت کننده ۵-فلوئورواوراسیل، (C) گروه اولئوروپین، تغییرات بافت‌شناسی خاصی مشاهده نشد و ساختار طبیعی فولیکول‌های تخمدان در این گروه حفظ گردید. (D) ظاهر طبیعی و سالم فولیکول‌های تخمدان در گروه درمان با ۵-فلوئورواوراسیل و اولئوروپین، درجه‌ای از خونریزی در این گروه قابل مشاهده است (۴۰×). موارد پاتولوژیک روی فتومیکروگراف‌ها با فلش نشان داده شده است (تصویر B).

جدول ۲. تغییرات پاتولوژیک در تخمدان‌ها در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌های مورد مطالعه	خونریزی	آترزی فولیکولی
کنترل	-	-
۵-فلوئورواوراسیل	+++	+++
اولئوروپین	-	-
اولئوروپین + ۵-فلوئورواوراسیل	++	-

(-) صفر، (+) درجه خفیف، (++) درجه متوسط و (+++) درجه شدید تغییرات

بحث

با افزایش میزان سرطان، کاهش عوارض جانبی طولانی مدت که پس از درمان بر بیماران عارض می شود بسیار مهم است. برای زنان، عواقب آسیب ناشی از شیمی درمانی به سیستم تولیدمثل شامل ناباروری و یائسگی زودرس است که بر شناخت، خلق و خو، قلب و عروق، استخوان ها، ترشح هورمون ها و سلامت جنسی تأثیر منفی می گذارد و خطر مرگ و میر زودرس را افزایش می دهد. این اثرات بلندمدت بر کیفیت زندگی بیمار تأثیر می گذارد با این حال، مکانیسم های دقیقی که از طریق آن عوامل شیمی درمانی باعث آسیب تخمدان، کاهش فولیکول اولیه و کاهش ترشح هورمون های جنسی می شوند هنوز مشخص نشده اند. از این رو، توسعه روش های دارویی مؤثر برای حفظ باروری، جلوگیری از نازائی و بهبود کیفیت زندگی پس از شیمی درمانی اهمیت دارند [۲۰].

مطالعات نشان داده است که اولئوروپین، مشتق اولیه برگ زیتون، دارای طیف وسیعی از اثرات دارویی است. از این اثرات می توان اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، کاهش روند پیری، گشادکنندگی عروق و ضد دیابتی را نام برد. در نتیجه، اولئوروپین می تواند در شرایط استرس زای سلول ها مانند سمیت، استرس اکسیداتیو و التهاب مفید باشد [۱۷]. در نتیجه، در این مطالعه، ما فرض می کنیم که اولئوروپین می تواند سمیت تخمدانی ناشی از ۵-فلوئورواوراسیل که یک داروی رایج مورد استفاده در رژیم های شیمی درمانی است را کاهش دهد [۳]. مطالعات حیوانی بسیار کمی وجود دارند که اثر حفاظتی اولئوروپین را بر روی سمیت ناشی از ۵-فلوئورواوراسیل در تخمدان ارزیابی کرده باشند.

مطالعه نارن^۱ و همکاران نشان داد که تجویز چند گانه داخل صفاقی ۵-فلوئورواوراسیل در موش های ماده

منجر به کوچک شدن تخمدان ها و کاهش تعداد جسم زرد در تخمدان و نارسایی تخمک گذاری می شود [۲۱]. همچنین دمیر^۲ و همکاران نشان دادند که تجویز ۵-فلوئورواوراسیل منجر به افزایش استرس اکسیداتیو، افزایش فاکتورهای التهابی و در نهایت آسیب تخمدان می شود [۲۲]. در مطالعه ای دیگر استرینگر^۳ و همکاران نشان دادند که درمان با ۵-فلوئورواوراسیل منجر به آتزی چشمگیر و پیشرونده فولیکول های در حال رشد و کاهش شدید حجم تخمدان به دلیل کاهش تعداد جسم زرد می شود [۲۰]. این مطالعات، یافته های مطالعه حاضر مبنی بر سمیت تخمدانی ۵-فلوئورواوراسیل را از طریق افزایش استرس اکسیداتیو، التهاب و اثر بر مورفولوژی تخمدان ها تأیید می کنند.

در زنان، تولیدمثل و تعادل انرژی توسط نوسانات هورمون های تخمدانی استرادیول و پروژسترون در طول چرخه قاعدگی ماهانه تنظیم می شود. هورمون های محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد برای تخمک گذاری، رشد آندومتر رحم و رفتار باروری مهم هستند تا احتمال اینکه جفت گیری منجر به بارداری شود، به حداکثر برسد. محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد ترشح هورمون های تخمدانی را از طریق مکانیسم های بازخورد منفی و مثبت تنظیم می کند. در روز اول و دوم چرخه، هورمون محرک فولیکولی (FSH) و هورمون لوتئینی (LH) که از هیپوفیز ترشح می شود، بلوغ فولیکول تخمدان، رشد و استروئیدزایی را تحریک می کند. این باعث افزایش تدریجی سطوح استرادیول در گردش می شود که توسط بازخورد منفی ناشی از استروئید در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد تنظیم می شود. افزایش سطح استرادیول برای القای افزایش هورمون لوتئینی که باعث تخمک گذاری سلول های فولیکولی و تولید پروژسترون می شود ضروری است. پروژسترون نیز

² Demir³ Stringer¹ Naren

انتقال آندومتر را از مرحله پرولیفراتیو به مرحله ترشحاتی امکان پذیر می کند، لانه سازی بلاستوسیت را تسهیل می کند و برای حفظ بارداری ضروری است. ترشح پی درپی استرادیول و پروژسترون به طور هم زمان در مدارهای عصبی تولیدمثلی و اندام های دستگاه تناسلی که رفتار تولیدمثلی را با آماده سازی آندومتر رحم برای جفت گیری و لانه گزینی بعدی جنین مهیا می کند، عمل می کند [۲۴،۲۳].

مطالعه حاضر نشان داد که تجویز هم زمان اولئوروپین می تواند تا حدودی اثرات سمی ۵-فلوئورواوراسیل بر روی تخمدان ها را کاهش داده و سطح استرادیول و پروژسترون را افزایش دهد. بنابراین به نظر می رسد اولئوروپین می تواند به عنوان ترکیبی طبیعی جهت جلوگیری از آسیب تخمدان ها به کار رود. برخی مطالعات تأثیر اولئوروپین بر پیشرفت آندومتریوز و باروری موش ها را بررسی و نشان دادند که در میان محصولات طبیعی، اولئوروپین به طور انتخابی فعالیت گیرنده استروژن بتا را مهار می کند. درمان با اولئوروپین، بیان گیرنده های استروژن بتا را در سلول های آندومتر پس از درمان با استرادیول متأثر می کند. درمان با اولئوروپین (۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم) با مهار تکثیر و فعال کردن آپوپتوز در آندومتریوز، ضایعات بدخیم را در موش های مبتلا به آندومتریوز سرکوب می کند و از ایجاد سمیت تولیدمثلی در موش های ماده تحت شیمی درمانی با اثر آنتی اکسیدانی، حذف رادیکال های آزاد و ضد التهابی جلوگیری می کند. علاوه بر این، موش های مبتلا به آندومتریوز که تحت درمان با اولئوروپین قرار می گیرند میزان باروری بالاتری نشان می دهند. این دارو تا حدی حذف سلول های استرومای آندومتریوز را از ضایعات آندومتریوز تسریع می کند. موش های تحت درمان با اولئوروپین مبتلا به آندومتریوز سطوح پایین تری از اینترلوکین ها و سایتوکین ها را دارند که نشان دهنده بهبود وضعیت التهابی موش های مبتلا به آندومتریوز است [۱۹].

علاوه بر این، در مطالعه حاضر، درمان با ۵-فلوئورواوراسیل باعث ایجاد تغییرات پاتولوژیک در بافت تخمدان از جمله تخریب فولیکول های تخمدان (آترزی فولیکولی) و خونریزی شد. به نظر می رسد که قدرت استرس اکسیداتیو بالای ۵-فلوئورواوراسیل دلیل اصلی این اختلالات است. استرس اکسیداتیو به عنوان عدم تعادل بین اکسیدان ها و آنتی اکسیدان ها در داخل سلول تعریف می شود. طبق تئوری استرس اکسیداتیو، این عدم تعادل می تواند اثرات منفی بر مولکول های سلولی مانند DNA، RNA و پروتئین ها داشته باشد و منجر به فعال شدن مسیر سیگنالینگ آپوپتوز و در نهایت تخریب سایتواسکلتون و مرگ سلولی شود. از طرفی، سیستم دفاع آنتی اکسیدانی سلول به عنوان یک مکانیسم دفاعی برای مقابله با این فرآیند تکامل یافته است شامل کاتالاز، گلو تاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و غیره که با عمل اسکانوجری باعث حذف رادیکال های آزاد اکسیژنی و نیتروژنی شده و تعادل را به سمت احیای سلول و تنظیم عملکرد بافت ها پیش می برند [۳]. در مطالعه حاضر دریافتیم که اولئوروپین باعث کاهش تغییرات مورفولوژیکی بافت تخمدان می شود. این اثرات محافظتی اولئوروپین ممکن است به دلیل خواص ضد آپوپتوزی، ضد التهابی و آنتی اکسیدانی قوی این دارو باشد، که با کاهش تغییرات پاتولوژیک در بافت تخمدان تأیید شد. همچنین محدودیت هایی مانع ارزیابی برخی پارامترهای مولکولی شد از جمله محدودیت هایی که در این مطالعه وجود داشت عدم امکان بررسی های فاکتورهای التهابی و برخی از عوامل آنتی اکسیدانی به دلیل بودجه محدود این طرح می توان ذکر نمود.

نتیجه گیری

این مطالعه به منظور ارائه شواهد مستند برای خواص درمانی و محافظتی بالقوه اولئوروپین در برابر سمیت تخمدانی ناشی از ۵-فلوئورواوراسیل طراحی شد.

اثرات مفید اولئوروپین (حاصل از برگ‌های درخت زیتون) مانند بهبود تغییرات پاتولوژیک تخمدان‌ها و افزایش سطح هورمون‌های جنسی استرادیول و پروژسترون در مطالعه حاضر به اثبات رسید.

مطالعه در قالب پایان‌نامه دانشجویی است هیچ کدام از نویسندگان این مطالعه، افراد و دستگاه‌ها تعارض منافع برای انتشار این مقاله ندارند. این مطالعه از نظر اخلاق در پژوهش توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اردبیل مورد تصویب قرار گرفت (با شناسه اخلاق: IR.ARUMS.AEC.1403.017).

تشکر و قدردانی

از حمایت‌های معاونت تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی اردبیل برای انجام این طرح تشکر و قدردانی می‌شود.

References

- 1- Timar M, Banaei S. Protective effect of saponin on sperm DNA fragmentation of mice treated with cyclophosphamide. *Andrologia*. 2022;54(2):e14336.
- 2- Golmohammadi MG, Banaei S, Timar M, Abedi A. Saponin protects against cyclophosphamide-induced kidney and liver damage via antioxidant and anti-inflammatory actions. *Physiol Int*. 2023;110(2):108-120.
- 3- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5):330-8.
- 4- Tanaka F, Fukuse T, Wada H, Fukushima M. The history, mechanism and clinical use of oral 5-fluorouracil derivative chemotherapeutic agents. *Curr Pharm Biotechnol*. 2000;1(2):137-64.
- 5- Chalabi-Dchar M, Fenouil T, Machon C, Vincent A, Catez F, Marcel V, et al. A novel view on an old drug, 5-fluorouracil: an unexpected RNA modifier with intriguing impact on cancer cell fate. *NAR cancer*. 2021;3(3):zcab032.
- 6- Chibber S, Farhan M, Hassan I, Naseem I. White light-mediated Cu (II)-5FU interaction augments the chemotherapeutic potential of 5-FU: an in vitro study. *Tumor Biol*. 2011;32:881-92.
- 7- Schwab M, Zanger UM, Marx C, Schaeffeler E, Klein K, Dippon Jr, et al. Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: a prospective clinical trial by the German 5-FU Toxicity Study Group. *J Clin Oncol*. 2008;26(13):2131-8.
- 8- Alter P, Herzum M, Soufi M, Schaefer J, Maisch B. Cardiotoxicity of 5-fluorouracil. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2006;4(1):1-5.
- 9- Kimura Y, Okuda H. Prevention by chitosan of myelotoxicity, gastrointestinal toxicity and immunocompetent organic toxicity induced by 5-fluorouracil without loss of antitumor activity in mice. *Jpn J Cancer Res*. 1999;90(7):765-74.
- 10- Al-Khrashi LA, Badr AM, AL-Amin MA, Mahran YF. Thymol ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: Evidence of down-regulatory effect on TGF- β /MAPK pathways through NF- κ B. *J Biochem Mol Toxicol*. 2022;36(1):e22932.
- 11- Noorbakhsh MF, Ahmadi N, Nazifi S, Nikraves A-A, Hosseini Fard SE. The protective effects of silymarin in 5-fluorouracil-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Iran Vet J*. 2022;18(3):103-13.
- 12- Safarpour S, Pirzadeh M, Ebrahimpour A, Shirafkan F, Madani F, Hosseini M, et al. Protective effect of kaempferol and its nanoparticles on 5-fluorouracil-induced cardiotoxicity in rats. *Biomed Res Int*. 2022;2273000.
- 13- Safarpour S, Safarpour S, Moghadamnia AA, Kazemi S, Ebrahimpour A, Shirafkan F, et al. Cardioprotective effect of silymarin nanoemulsion on 5-fluorouracil-induced cardiotoxicity in rats. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2022;355(7):e2200060.
- 14- Rishmawi S, Haddad F, Dokmak G, Karaman R. A Comprehensive Review on the Anti-Cancer Effects of Oleuropein. *Life*. 2022;12(8):1140.
- 15- Romero-Márquez JM, Navarro-Hortal MD, Jiménez-Trigo V, Vera-Ramírez L, Forbes-Hernández TJ, Esteban-Munoz A, et al. An oleuropein rich-olive (*Olea europaea* L.) leaf extract

- reduces β -amyloid and tau proteotoxicity through regulation of oxidative-and heat shock-stress responses in *Caenorhabditis elegans*. *Food Chem Toxicol*. 2022;162:112914.
- 16- Hadrich F, Mahmoudi A, Chamkha M, Isoda H, Sayadi S. Olive leaves extract and oleuropein improve insulin sensitivity in 3T3-L1 cells and in high-fat diet-treated rats via PI3K/AkT signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2023;6828230.
- 17- Menezes RCR, Peres KK, Costa-Valle MT, Faccioli LS, Dallegrave E, Garavaglia J, et al. Oral administration of oleuropein and olive leaf extract has cardioprotective effects in rodents: A systematic review. *Rev Port Cardiol*. 2022;41(2):167-175.
- 18- Pojero F, Aiello A, Gervasi F, Caruso C, Ligotti ME, Calabrò A, et al. Effects of oleuropein and hydroxytyrosol on inflammatory mediators: Consequences on inflammaging. *Int J Mol Sci*. 2022;24(1):380.
- 19- Geyikoglu F, Emir M, Colak S, Koc K, Turkez H, Bakir M, et al. Effect of oleuropein against chemotherapy drug-induced histological changes, oxidative stress, and DNA damages in rat kidney injury. *J Food Drug Anal*. 2017;25(2):447-459.
- 20- Stringer JM, Swindells EO, Zerafa N, Liew SH, Hutt KJ. Multidose 5-fluorouracil is highly toxic to growing ovarian follicles in mice. *Toxicol Sci*. 2018;166(1):97-107.
- 21- Naren G, Wang L, Zhang X, Cheng L, Yang S, Yang J, et al. The reversible reproductive toxicity of 5-fluorouracil in mice. *Reprod Toxicol*. 2021;101:1-8.
- 22- Demir EA, Mentese A, Demir S, Kucuk H, Turkmen N, Aliyazicioglu Y. Evaluation of therapeutic effect of chrysin against 5-Fluorouracil-induced ovarian damage in rats. *Farabi Tıp Dergisi*. 2023;2(1):1-7.
- 23- Taraborrelli S. Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2015;94 Suppl 161:8-16.
- 24- Sinchak K, Wagner EJ. Estradiol signaling in the regulation of reproduction and energy balance. *Front Neuroendocrinol*. 2012;33(4):342-63.