

مقاله پژوهشی

تحلیل و بررسی اثر داروی کربوپلاتین بر روی اووژنز و تغییرات رحمی در موش بالغ نژاد NMRI در شرایط *In vivo*

سپیده غلامی یاراحمدی^۱، نسیم حیاتی رودباری^{۱*}، کاظم پریور^۱، غلامحسین واعظی^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران

* Email: nasimhayati@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۲/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۷/۲۴

چکیده

سرطان (Cancer) یکی از بیماری‌های شایع در سراسر دنیا می‌باشد. از مهم‌ترین روش‌های درمانی برای سرطان شیمی درمانی است که به وسیله رژیم‌های دارویی مختلفی انجام می‌گیرد. یکی از داروهای رایج در شیمی درمانی «کربوپلاتین» است. هدف از این کار تحقیقاتی بررسی تاثیر داروی کربوپلاتین بر روی تخمک‌زایی و تغییرات رحمی در موش نژاد NMRI است. در این پژوهش ۳۰ سر موش به پنج گروه کنترل، شم و سه گروه تجربی تقسیم شدند. داروی کربوپلاتین در سه دوز ۱۲۰، ۶۰، ۳۰ mg/kg به صورت زیرجلدی به موش‌های تجربی تزریق شد و پس از تشریح حیوانات، تخمدان و رحم جدا شدند و تحت مراحل تهیه بافت و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین قرار گرفتند. همچنین خونگیری جهت بررسی دو هورمون استرادیول و FSH انجام شد. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک طرفه مورد تحلیل آماری قرار گرفتند. نتایج بیانگر آن است که در اثر مصرف داروی کربوپلاتین، در فولیکول‌های بدوی، ثانویه، گراف، جسم زرد و رگ‌های خونی کاهش معنی‌دار و در فولیکول‌های آنترتیک افزایش مشاهده گردید. قطر کلی تخمدان در هر سه گروه تجربی کاهش یافت اما در قطر فولیکول‌ها تغییر چشمگیری دیده نشد. در بررسی‌های رحمی، قطر رحم، لایه‌های آن، ضخامت لومن و تعداد غدد ترشچی در گروه‌های تجربی کاهش یافت. همچنین میزان دو هورمون FSH و استرادیول کاهش یافت. با توجه به اختلال در سیستم هورمونی و کاهش تعداد فولیکول‌های بدوی، ثانویه و گراف و افزایش فولیکول‌های آنترتیک، داروی کربوپلاتین بر روی باروری تاثیر منفی داشته است.

کلیدواژه‌ها: کربوپلاتین، اووژنز، تغییرات رحمی، فولیکول‌های تخمدان، موش نژاد NMRI.

مقدمه

منجر به تخریب و فاسد شدن بافت‌های سالم می‌شود. سرطان تخمدان در بین بدخیمی‌های ژنیکولوژیک از بیشترین میزان مرگ و میر برخوردار است. درمان‌های

سرطان نوعی بیماریست که در آن سلول‌ها توانایی تقسیم و رشد عادی خود را از دست می‌دهند و این موضوع

مختلفی برای بیماران مبتلا به سرطان تخمدان با توجه به شرایط بیمار به کار گرفته می‌شود که می‌توان به جراحی، کموتراپی و رادیوتراپی اشاره نمود [۳،۹]. با وجود پیشرفت‌های زیادی که در درمان سرطان تخمدان به دست آمده است، اکثر بیماران بعد از گذشت مدتی از درمان مجدداً سرطان در آن‌ها عود کرده و طی ۵ سال بر اثر سرطان می‌میرند [۶،۱۵]. در مطالعات گذشته، تاثیر درمان با داروهای ضد سرطانی که دارای ترکیبات حاوی پلاتینیوم بودند، بر روی سرطان تخمدان مورد بررسی قرار گرفته و تاثیرات مثبت داروها در درمان و بهبود بیماران مشاهده شده است [۸، ۱۴]. از بین رفتن همه فولیکول‌های تخمدان که به قطع شدن چرخه طبیعی عملکرد تخمدان منجر می‌شود، نارسایی زودرس تخمدان نام دارد [۱]. تابیدن اشعه به تخمدان‌ها، شیمی درمانی و مصرف بعضی از داروها و همین‌طور جراحات شدید به عروق و بافت تخمدان ممکن است سبب نارسایی تخمدان شود [۲]. از مهم‌ترین و پرکاربردترین درمان‌ها برای سرطان شیمی درمانی می‌باشد. برخی از این داروها بر روی عملکرد تخمدان هیچگونه اثری ندارند، در حالی که بعضی دیگر اثرات وسیعی بر روی تخمدان داشته و منجر به هیپوگنادیسم دائمی می‌شوند. به طور معمول تخمدان زنانه که تحت شیمی درمانی قرار می‌گیرند، دارای تعداد فولیکول‌های اولیه نرمال هستند، درحالی‌که تعداد فولیکول‌های بالغ به ویژه فولیکول‌های گراف، بیشتر کاهش پیدا می‌کنند و این نشان دهنده تاثیر بیشتر این داروها بر روی توسعه و تکامل این فولیکول‌هاست [۱۹]. یکی از داروهای مورد استفاده برای شیمی درمانی بسیاری از سرطان‌ها کربوپلاتین می‌باشد که با نام تجاری پاراپلاتین و فرمول شیمیایی $6H12N2O4PtC$ به خانواده داروهای ضد سرطان به نام ترکیبات حاوی پلاتینیوم تعلق دارد. کربوپلاتین، به مدت طولانی برای درمان انواع سرطان‌ها از جمله تومورهای ریه، بیضه، سینه، سر و گردن، مغز و به خصوص برای درمان سرطان تخمدان استفاده شده است. شبیه به مکانیسم عمل سیس پلاتین، کربوپلاتین به طور کووالانسی به DNA متصل شده و به شکل ترکیب‌های افزایشی DNA پلاتین باعث القاء آپوپتوز سلول‌های

سرطانی می‌شود. کربوپلاتین موجب اتصال متقاطع رشته‌های DNA می‌شود و بدین طریق از رونویسی، ترجمه و تقسیم سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند [۱۰]. بیماران دچار سرطان‌های بیضه‌ای، به طور ویژه‌ای تحت تاثیر درمان با شیمی درمانی بر اساس داروی سیس پلاتین که یکی از داروهای مهم ترکیبات پلاتینیوم‌دار است، هستند. سیس پلاتین عوارض جانبی شدیدی مثل اختلالات عصبی، اختلالات گوارشی و اختلالات شدید رفتاری در انسان ایجاد می‌کند که مقدار دوز تزریقی سیس پلاتین را محدود می‌کنند [۲۲]. بنابراین، ترکیبات پلاتینیوم دار دیگری به منظور توسعه ی سیر درمانی و کاهش عوارض جانبی شیمی درمانی مورد بررسی و پیشرفت قرار گرفت. نماینده ی اصلی این ترکیبات کشف شده کربوپلاتین [$diammine(cyclobutane-1,1-dicarboxylato)platinum(II)$] بود که طیف عملکرد و فعالیتی مشابه سیس پلاتین را نشان می‌داد. اما با الگوی متفاوتی از سمیت و فاقد علائم نفروتوکسیکی، عصبی و زخم معده همراه بود. اگرچه سرکوب مغز استخوان نیز مشابه سیس پلاتین از عوارض این دارو بود که باعث محدود شدن دوز این دارو می‌شد [۵، ۱۱، ۱۷]. بنابراین کربوپلاتین با مشخصاتی بهتر از سیس پلاتین به عنوان داروی خط اول درمان انواع سرطان جایگزین شده است [۱۶]. تقریباً تمام بیماران تحت شیمی درمانی به طور بالقوه در معرض خطر ناباروری موقتی یا دائمی هستند [۲۱]. براساس تحقیقات انجام شده تاثیر کربوپلاتین بر مورفولوژی بیضه انجام شده و در نتیجه آن فرآیندهای اسپرماتوژنز توسط عمل سیتوتوکسیک کربوپلاتین مختل می‌شوند که احتمالاً نتیجه فعل و انفعالات مولکولی محصولات پلاتین- کربوپلاتین و DNA می‌باشد [۲۰].

در این پژوهش اثر داروی کربوپلاتین بر اووژنز و بافت تخمدان و رحم و میزان هورمون‌های استرادیول و FSH بررسی شد که تاکنون هیچگونه بررسی در این زمینه انجام نشده بود و از این لحاظ پژوهش ما دارای نوآوری است و می‌تواند راهگشای بررسی اثرات اووژنری این دارو باشد.

روش کار:

شاخ‌های رحم جدا گردیده و در آب مقطر شستشو داده شد، سپس چربی و بافت‌های اضافی در سرم فیزیولوژی جدا شد و وزن هر بافت به طور جداگانه با ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. هرکدام از بافت‌ها در مک کارتی‌های جداگانه و در داخل بوئن قرار داده شد و پس از گذشت ۴ ساعت، الکل ۷۰ درصد جایگزین شد و تمامی بافت‌ها تا زمان شروع مراحل الکل دهی در الکل ۷۰ درصد باقی ماندند.

مراحل آماده‌سازی بافت‌ها

بافت‌ها طبق پروتوکل معمول آماده‌سازی شدند و مراحل الکل‌دهی، آب‌گیری، شفاف‌سازی، پارافین‌دهی، قالب‌گیری و برش‌گیری انجام شد. برش‌ها به صورت سریالی و پشت سرهم انجام شده و لام‌ها توسط روش هماتوکسیلین-انوزین رنگ‌آمیزی شدند. در پایان لام‌ها پس از لامل‌گذاری آماده‌ی بررسی‌های میکروسکوپی شدند و مقاطع میکروسکوپی بوسیله میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت و هم‌هی نمونه‌های تجربی با نمونه‌های کنترل و شم مقایسه و تغییرات ایجاد شده ثبت گردید. شمارش سلول‌ها به صورت اتفاقی در ده لام از هر گروه و ده میدان دید به‌طور تصادفی توسط گراتیکول مشبک انجام شد. پارامترهای اندازه‌گیری شده شامل وزن موش‌ها، وزن تخمدان‌ها، تعداد فولیکول‌های بدوی، تعداد فولیکول‌های اولیه، تعداد فولیکول‌های ثانویه، تعداد فولیکول‌های گراف، تعداد فولیکول‌های آترتیک، تعداد جسم زرد، تعداد رگ‌های خونی، قطر فولیکول‌های بدوی، قطر فولیکول‌های اولیه، قطر فولیکول‌های ثانویه، قطر فولیکول‌های گراف، قطر فولیکول‌های آترتیک، قطر جسم زرد، قطر رگ‌های خونی، قطر کلی تخمدان‌ها، قطر رحم، تعداد غدد رحمی، ضخامت از لومن تا آخرین لایه، ضخامت لومن رحم، ضخامت لایه‌های رحم شامل آندومتر، میومتر و پریمتر، همچنین میزان سطح سرمی هورمون‌های استرادیول و FSH بررسی شد. همچنین سنجش هورمون‌ها با روش Sandwich Enzyme (ELISA) انجام گرفت. نتایج به دست آمده از انجام آزمایشات توسط نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک طرفه one-way ANOVA و تست Tukey برای تجزیه و

این پژوهش و تمامی آزمایشات آن در مجتمع آزمایشگاهی رازی واقع در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران انجام شد. به منظور بررسی اثرات بیولوژیک داروی کربوپلاتین از موش‌های سوری ماده‌ی بالغ نژاد ان‌ام آر‌آی استفاده شد. موش‌های سوری ماده‌ی سالم بالغ با سن حدودی ۶-۸ هفته توسط مجتمع آزمایشگاهی رازی دانشگاه از انستیتو پاستور خریداری شدند. پس از حمل به اتاق حیوانات، به منظور تطبیق این حیوانات با محیط جدید موش‌ها به مدت یک هفته در قفس‌های پلاستیکی در دمای ۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱۲ ساعت در تاریکی و ۱۲ ساعت در روشنایی نگهداری شدند. شرایط محیطی از نظر دما، رطوبت، نور و سایر عوامل مثل تغذیه جانور تحت کنترل قرار گرفت. بدین منظور که وزن بدن موش‌ها به وزن ایده‌آل ۲۶-۳۰ گرم برسد، موش‌ها برای مدت ۲ هفته در این شرایط نگهداری شدند و سپس کار پژوهشی بر روی آن‌ها آغاز گردید. موش‌های ماده‌ی بالغ به پنج گروه کنترل، گروه شم و سه گروه تجربی ۱ و ۲ و ۳ که هر گروه شامل شش موش ماده بود به شرح زیر تقسیم بندی شدند: گروه کنترل: موش‌های ماده‌ای که فقط از غذا و آب مخصوص موش‌ها، که همه گروه‌ها از آن تغذیه کرده بودند، استفاده کرده اما داروی کربوپلاتین یا حلال آن را دریافت نکرده‌اند. گروه شم: موش‌های ماده که ۰/۴۰ میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر را هفته‌ای یک بار و به مدت ۴ هفته دریافت کردند. گروه تجربی ۱: موش‌های ماده که داروی کربوپلاتین را با دوز ۱۲۰ mg/kg (۰/۳۶ میلی لیتر) هفته‌ای یک بار و به مدت ۴ هفته دریافت کردند. گروه تجربی ۲: موش‌های ماده که داروی کربوپلاتین را با دوز ۶۰ mg/kg (۰/۱۸ میلی لیتر) هفته‌ای یک بار و به مدت ۴ هفته دریافت کردند. گروه تجربی ۳: موش‌های ماده که داروی کربوپلاتین را با دوز ۳۰ mg/kg (۰/۰۹ میلی لیتر) هفته‌ای یک بار و به مدت ۴ هفته دریافت کردند. موش‌های هر گروه پس از اتمام ۴ هفته تزریق، در محفظه‌ی اثر بیهوش و کشته شدند و دراین بین گروه کنترل، بدون دریافت هیچ ماده‌ی خاصی بیهوش و تشریح شدند. پس از آن بافت‌های تخمدان چپ و راست و

تحلیل داده‌ها استفاده شد و نمودارها توسط نرم افزار Excel ترسیم شدند.

نتایج:

طبق نتایج به دست آمده، وزن موش‌ها قبل از تشریح در گروه تجربی یک و همینطور گروه تجربی دو، کاهش معنی‌دار ($P < 0.001$) نسبت به گروه کنترل نشان دادند (جدول ۱). همه تخمدان‌ها بعد از تشریح، بوسیله ترازوی دیجیتال برحسب گرم وزن شدند. نتایج حاصل از وزن تخمدان‌های گروه‌های تجربی یک و دو، کاهش معنی‌دار ($P < 0.001$) نسبت به گروه کنترل را نشان دادند و همینطور تخمدان‌های گروه تجربی سه، کاهش معنی‌دار ($P < 0.01$) را نسبت به دو گروه کنترل نشان دادند (جدول ۲). برش‌های تخمدان به طور میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت و انواع فولیکول‌های تخمدان در تمام گروه‌ها به دقت مورد شمارش قرار گرفت و نتایج بررسی شد. تعداد فولیکول‌های بدوی در هر سه گروه تجربی یک، دو و سه نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار ($P < 0.001$) داشت (نمودار ۱). تعداد فولیکول‌های اولیه تقریباً نرمال بود و تغییر زیادی نداشت و تنها در گروه تجربی اول کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) را نسبت به کنترل نشان داد (جدول ۳). تعداد فولیکول‌های ثانویه در گروه تجربی یک کاهش معنی‌دار ($P < 0.001$) و در گروه تجربی دو کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) را نسبت به گروه‌های کنترل نشان داد (نمودار ۲). تعداد فولیکول‌های گراف کاهش چشمگیری داشت و گروه‌های تجربی یک و دو کاهش معنی‌دار ($P < 0.001$) و گروه تجربی سه کاهش معنی‌دار ($P < 0.01$) را نسبت به کنترل نشان داد (جدول ۳). تعداد رگ خونی کاهش قابل توجهی داشته و در گروه تجربی یک و دو کاهش معنی‌دار ($P < 0.001$) و در گروه تجربی سه، کاهش معنی‌دار ($P < 0.01$) نسبت به گروه

کنترل دیده شد (جدول ۳). در تمام موارد گروه‌های کنترل و شم به نسبت زیادی شبیه به هم بوده و تفاوت چشمگیری بین آنها دیده نشد. در این پژوهش برای اندازه‌گیری قطر انواع فولیکول‌ها، رگ‌های خونی و جسم زرد از خط کش اکولری میکروسکوپ استفاده کردیم و قطرها برحسب میکرومتر اندازه‌گیری شده است. برطبق نتایج به دست آمده از آزمایشات، هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری در قطر فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف گروه‌های تجربی و شم نسبت به گروه کنترل دیده نشد و تنها مقدار کمی از قطر آن‌ها کاهش یافته بود. در قطر فولیکول‌های آترتیک در گروه تجربی یک افزایش معنی‌دار ($P < 0.001$) و در گروه تجربی دو افزایش معنی‌دار ($P < 0.01$) نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. قطر جسم زرد در گروه تجربی یک کاهش معنی‌دار ($P < 0.01$) و در گروه تجربی دو کاهش معنی‌دار ($P < 0.05$) داشت. قطر گروه شم تغییر مشخصی نکرده و تقریباً همانند گروه کنترل دیده شد (جدول ۴). طبق بررسی‌های انجام شده، قطر رحم در گروه‌های تجربی یک و دو به ترتیب کاهش معنی‌دار ($P < 0.001$) و ($P < 0.05$) را نشان داد. قطر ضخامت از لومن تا آخرین لایه دارای دو کاهش معنی‌دار ($P < 0.001$) در گروه‌های تجربی یک و دو بود. همچنین ضخامت لومن در گروه تجربی یک دارای کاهش معنی‌دار ($P < 0.001$) می‌باشد. قطر لایه اندومتر و پریمتر رحم دارای بیشترین تغییرات بوده و در هر سه گروه تجربی آن‌ها، کاهش معنی‌دار ($P < 0.001$) دیده شد. همچنین در قطر لایه میومتر رحم در گروه تجربی یک کاهش معنی‌دار ($P < 0.001$)، در گروه تجربی دو کاهش معنی‌دار ($P < 0.01$) و در گروه تجربی سه کاهش معنی‌دار ($P < 0.05$) مشاهده گردید. برطبق مشاهدات انجام شده از بررسی تعداد غدد، در تعداد غدد ترشحات رحم در گروه‌های تجربی یک و دو کاهش شدید و معنی‌دار ($P < 0.001$) نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید (جدول ۵، ۶). در بررسی سطح سرمی هورمون استرادیول برحسب پیکوگرم بر میلی‌لیتر، گروه تجربی یک و دو، کاهش معنی‌دار ($P < 0.001$) نسبت به گروه کنترل نشان دادند. میزان هورمون FSH برحسب نانوگرم بر میلی‌لیتر نیز در دو گروه

کنترل، شم، تجربی یک، تجربی دو و تجربی سه قرار داده شده که به خوبی انواع فولیکول‌ها و لایه‌های رحم در آن‌ها مشخص شده است (شکل ۱، ۲).

تجربی یک و دو کاهش معنی‌دار ($P < 0/001$) نسبت به گروه کنترل نشان دادند (جدول ۷). در ادامه نمودارها و جداول مربوطه آورده شده است و همچنین فتومیکروگراف‌هایی از تخمدان‌ها و رحم هر پنج گروه

جدول (۱) وزن موش‌ها قبل از تشریح در گروه‌های آزمایشی کنترل، شم و تجربی ۱ و ۲ و ۳ در شرایط *In vivo* (اعداد میانگین \pm انحراف معیار است)

| تجربی سه | تجربی دو | تجربی یک | شم | کنترل | گروه آزمایشی |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| 31.1667 \pm 0.74907 | 26.8333 \pm 1.01379 | 23.6667 \pm 0.88192 | 34.0000 \pm 0.77460 | 32.8333 \pm 0.60093 | وزن موش‌ها قبل از تشریح (برحسب گرم) |

جدول (۲) نتایج تحلیل مقایسه‌ای وزن تخمدان موش‌ها در گروه‌های آزمایشی کنترل، شم و گروه تجربی ۱ و ۲ و ۳ (اعداد میانگین \pm انحراف معیار است)

| تجربی سه | تجربی دو | تجربی یک | شم | کنترل | گروه‌های آزمایشی |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------|
| 0.0300 \pm 0.00365 | 0.0183 \pm 0.00477 | 0.0100 \pm 0.00000 | 0.0400 \pm 0.00730 | 0/0533 \pm 0.00333 | پارامتر |
| | | | | | وزن تخمدان |

جدول (۳) نتایج تحلیل مقایسه‌ای حاصل از شمارش فولیکول اولیه، جسم زرد و تعداد رگ خونی در گروه‌های آزمایشی کنترل، شم و تجربی ۱ و ۲ و ۳ در شرایط *In vivo* (اعداد میانگین \pm انحراف معیار است)

| تجربی سه | تجربی دو | تجربی یک | شم | کنترل | گروه‌های آزمایشی | ردیف |
|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|------|
| 11.8333 \pm 1.13774 | 11.1667 \pm 0.87242 | 9.6667 \pm 0.76012 | 12.6667 \pm 1.08525 | 14.1667 \pm 1.07755 | تعداد فولیکول اولیه | ۱ |
| 2.6667 \pm 0.42164 | 2.5000 \pm 0.34157 | 1.5000 \pm 0.22361 | 3.5000 \pm 0.34157 | 3.8333 \pm 0.40139 | تعداد جسم زرد | ۲ |
| 5.3333 \pm 0.33333 | 4.8333 \pm 0.47726 | 2.6667 \pm 0.42164 | 7.1667 \pm 0.30732 | 7.8333 \pm 0.47726 | تعداد رگ خونی | ۳ |

جدول (۴) نتایج تحلیل مقایسه‌ای حاصل از قطر انواع فولیکول‌ها، جسم زرد و تعداد رگ خونی در گروه‌های آزمایشی کنترل، شم و تجربی ۱ و ۲ و ۳ در شرایط *In vivo* (اعداد میانگین \pm انحراف معیار است)

| تجربی سه | تجربی دو | تجربی یک | شم | کنترل | گروه‌های آزمایشی | ردیف |
|-------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|---------------------|------|
| 2.1667 \pm 0.16667 | 2.0833 \pm 0.083333 | 2.0000 \pm 0.00000 | 2.2500 \pm 0.17078 | 2.4167 \pm 0.20069 | قطر فولیکول بدوی | ۱ |
| 10.8333 \pm 1.01379 | 10.3333 \pm 0.084327 | 10.3333 \pm 0.84327 | 11.3333 \pm 1.14504 | 12.3333 \pm 1.35810 | قطر فولیکول اولیه | ۲ |
| 17.3333 \pm 1.96073 | 16.3333 \pm 1.64655 | 15.1667 \pm 1.72079 | 19.1667 \pm 2.50887 | 19.8333 \pm 2.60021 | قطر فولیکول ثانویه | ۳ |
| 22.0000 \pm 2.30940 | 20.0000 \pm 2.68238 | 16.6667 \pm 3.54652 | 25.5000 \pm 1.60728 | 24.5000 \pm 1.60728 | قطر فولیکول آنترال | ۴ |
| 21.1667 \pm 0.83333 | 25.8333 \pm 2.00693 | 26.6667 \pm 1.66667 | 17.8333 \pm 1.01379 | 16.6667 \pm 0.84327 | قطر فولیکول آنتریکه | ۵ |
| 17.1667 \pm 1.64148 | 15.8333 \pm 1.40040 | 14.1667 \pm 1.53659 | 20.6667 \pm 1.94365 | 22.5000 \pm 1.11803 | قطر جسم زرد | ۶ |
| 4.5000 \pm 0.42817 | 2.6667 \pm 0.33333 | 1.5000 \pm 0.22361 | 6.6667 \pm 0.33333 | 8.1667 \pm 0.60093 | قطر رگ | ۷ |
| 120.0000 \pm 10.00000 | 105.0000 \pm 5.62731 | 95.0000 \pm 2.23607 | 143.3333 \pm 2.10819 | 145.0000 \pm 2.23607 | قطر کلی تخمدان | ۸ |

جدول (۵) نتایج تحلیل مقایسه ای حاصل از قطر لایه های رحمی (برحسب میکرومتر) در گروه های آزمایشی کنترل، شم و تجربی ۱ و ۲ و ۳ در شرایط *In vivo* (اعداد میانگین \pm انحراف معیار است)

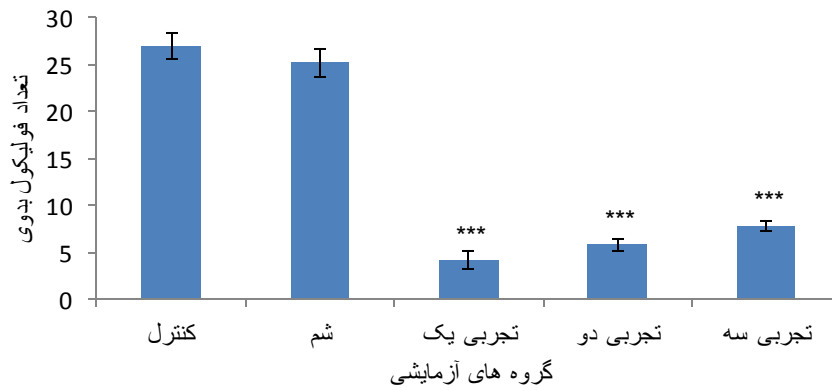
| ردیف | گروه آزمایشی پارامتر | کنترل | شم | تجربی یک | تجربی دو | تجربی سه |
|------|-----------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| ۱ | قطر رحم | 135.0000 \pm 3.41565 | 131.6667 \pm 1.66667 | 65.0000 \pm 7.18795 | 88.8333 \pm 15.51433 | 115.8333 \pm 10.52114 |
| ۲ | ضخامت از لومن تا آخرین لایه | 89.1667 \pm 2.38630 | 85.8333 \pm 2.38630 | 42.5000 \pm 3.59398 | 49.1667 \pm 3.27024 | 78.3333 \pm 7.92324 |
| ۳ | ضخامت لومن رحم | 9.6667 \pm 1.11555 | 8.1667 \pm 0.60093 | 3.8333 \pm 0.54263 | 6.8333 \pm 1.07755 | 8.5000 \pm 1.45488 |
| ۴ | ضخامت آندومتر | 73.3333 \pm 1.66667 | 70.0000 \pm 1.29099 | 16.6667 \pm 2.78887 | 25.0000 \pm 2.23607 | 37.5000 \pm 4.23281 |
| ۵ | ضخامت میومتر | 11.6667 \pm 1.05409 | 10.8333 \pm 0.54263 | 4.5000 \pm 0.22361 | 7.1667 \pm 0.30732 | 8.3333 \pm 0.84327 |
| ۶ | ضخامت پریمتر | 10.3333 \pm 0.33333 | 10.0000 \pm 0.00000 | 4.3333 \pm 0.21082 | 7.1667 \pm 0.30732 | 6.3333 \pm 0.49441 |

جدول (۶) نتایج تحلیل مقایسه ای حاصل از تعداد غدد رحمی در گروه های آزمایشی کنترل، شم و تجربی ۱ و ۲ و ۳ در شرایط *In vivo* (اعداد میانگین \pm انحراف معیار است)

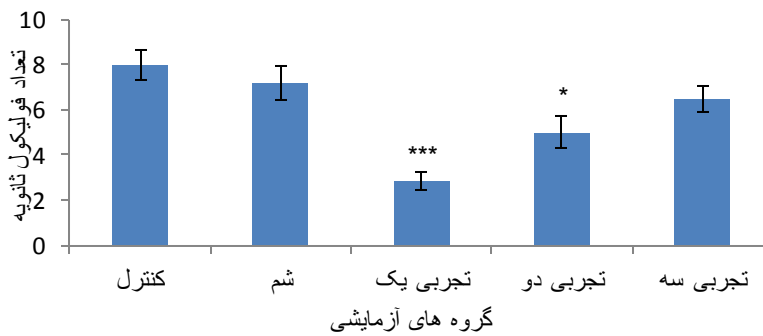
| ردیف | گروه های آزمایشی پارامتر | کنترل | شم | تجربی یک | تجربی دو | تجربی سه |
|------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | تعداد غدد رحمی | 36.6667 \pm 3.33333 | 35.0000 \pm 2.58199 | 12.8333 \pm 3.00463 | 13.6667 \pm 2.02759 | 25.3333 \pm 3.28295 |

جدول (۷) نتایج تحلیل مقایسه ای حاصل از میزان هورمون های استرادیول و FSH در گروه های آزمایشی کنترل، شم و تجربی ۱ و ۲ و ۳ در شرایط *In vivo* (اعداد میانگین \pm انحراف معیار است)

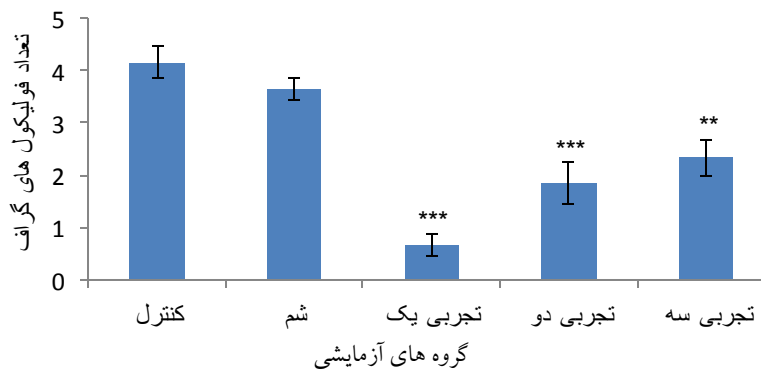
| ردیف | گروه آزمایشی پارامتر | کنترل | شم | تجربی یک | تجربی دو | تجربی سه |
|------|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | میزان هورمون استرادیول | 2.0400 \pm 0.06126 | 1.9850 \pm 0.05720 | 1.0350 \pm 0.03160 | 1.3950 \pm 0.04418 | 2.0450 \pm 0.02513 |
| | میزان هورمون FSH | 4.4350 \pm 0.08016 | 4.1817 \pm 0.11580 | 2.4483 \pm 0.09464 | 3.0667 \pm 0.06566 | 4.2883 \pm 0.11116 |



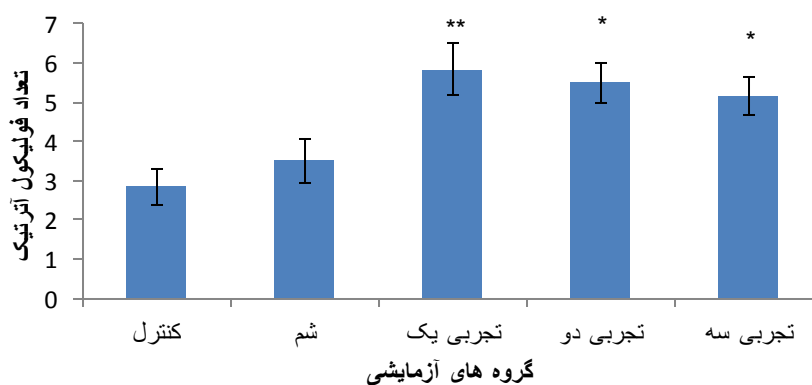
نمودار ۱: مقایسه تعداد فولیکول های بدوی در گروه های آزمایشی کنترل، شم و تجربی ۱ (دوز ۱۲۰ mg/kg)، تجربی ۲ (دوز ۶۰ mg/kg)، تجربی ۳ (دوز ۳۰ mg/kg) موش بالغ نژاد NMRI در شرایط *In vivo* (*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $p < 0.05$)



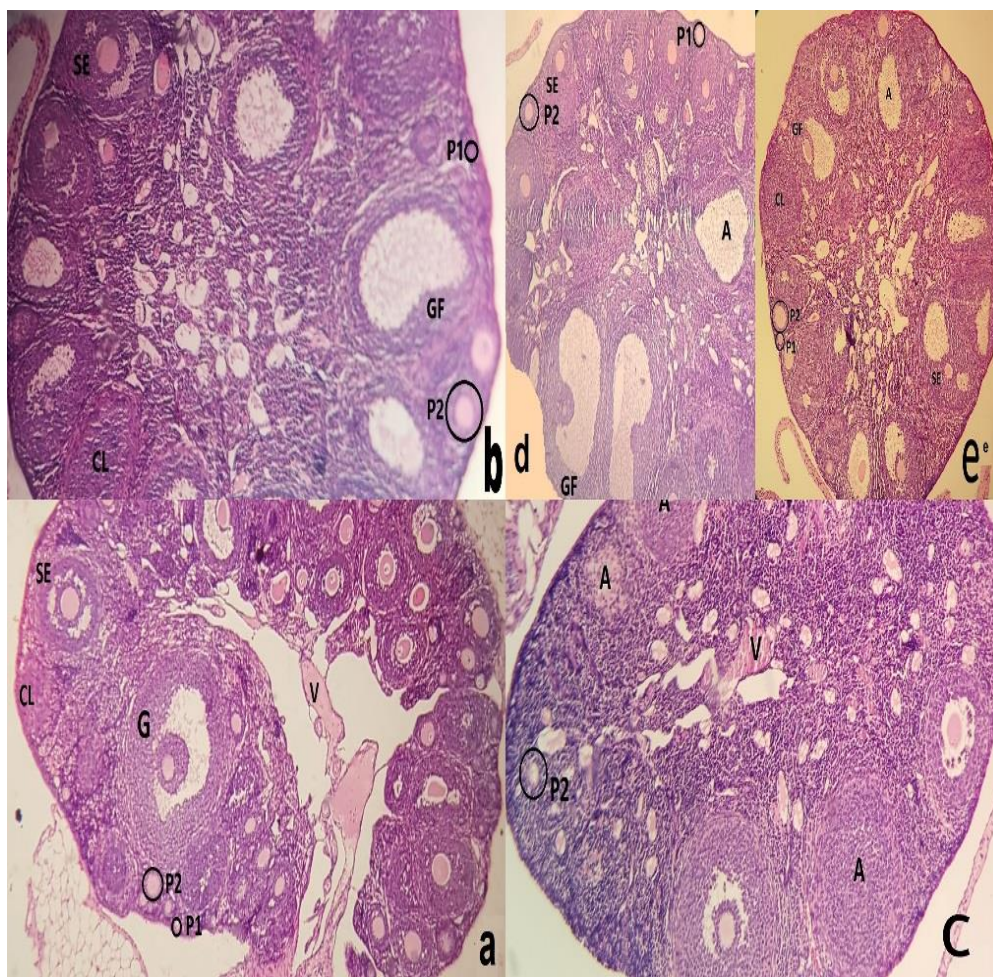
نمودار ۲: مقایسه تعداد فولیکول های ثانویه در گروه های آزمایشی کنترل، شم و تجربی ۱ (دوز ۱۲۰ mg/kg)، تجربی ۲ (دوز ۶۰ mg/kg)، تجربی ۳ (دوز ۳۰ mg/kg) موش بالغ نژاد NMRI در شرایط *In vivo* (*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $p < 0.05$)



نمودار ۳: مقایسه تعداد فولیکول های گراف در گروه های آزمایشی کنترل، شم و تجربی ۱ (دوز ۱۲۰ mg/kg)، تجربی ۲ (دوز ۶۰ mg/kg)، تجربی ۳ (دوز ۳۰ mg/kg) موش بالغ نژاد NMRI در شرایط *In vivo* (*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $p < 0.05$)



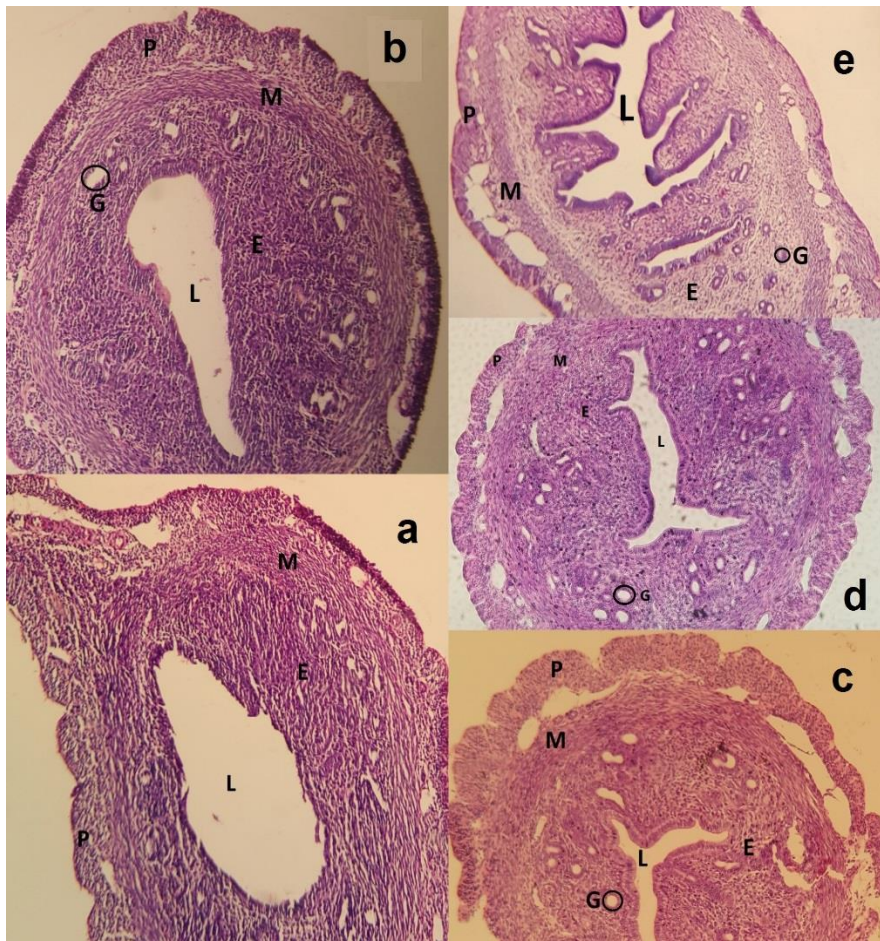
نمودار ۴: مقایسه تعداد فولیکول های آترتیک در گروه های آزمایشی کنترل، شم و تجربی ۱ (دوز ۱۲۰ mg/kg)، تجربی ۲ (دوز ۶۰ mg/kg)، تجربی ۳ (دوز ۳۰ mg/kg) موش بالغ نژاد NMRI در شرایط *In vivo* (***) $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $p < 0.05$)



شکل ۱: فتومیکروگراف تخمدان موش. (a) گروه کنترل (b) گروه

شم (c) تجربی ۱ (d) تجربی ۲ (e) تجربی ۳ (بزرگنمایی ۱۰۰)

فولیکول بدوی: P1، فولیکول اولیه: P2، فولیکول ثانویه: SE، جسم زرد: CL، فولیکول گرااف: G



شکل ۴: فوتومیکروگراف رحم موش، (a) گروه کنترل، (b) شام، (c) تجربی ۱، (d) تجربی ۲، (e) تجربی ۳ (بزرگنمایی ۱۰۰)
 لومن: L، اندومتر: E، میومتر: M، پریمتر: P، غدد: G

بحث

موش در مقایسه با سیس پلاتین کاربردی در سطوح دوز سمی بررسی کرد. در آخر هر دوی این ترکیبات باعث تغییرات ساختاری شدید در سلول‌های سرتولی، اختلال در سد خونی/ بیضه شدند و هر دو روند اسپرماتوژنز و اسپرمیوژنز را دچار اختلال کردند. همچنین موش‌ها در درمان با دوز بالای داروی کربوپلاتین دچار کاهش وزن شدند. این نتایج تایید کرد که کربوپلاتین به اندازه‌ی سیس پلاتین برای بیضه‌ها سمی است و باعث تأثیرات منفی بر روی باروری موش‌ها می‌شود [۱۳]. در بررسی‌های انجام شده در تحقیق حاضر نیز، کاهش وزن در موش‌های گروه‌های تجربی رخ داد، به خصوص در موش‌های گروه تجربی سوم که تحت درمان با دوز بالای کربوپلاتین قرار گرفته بودند، شاهد کاهش وزن شدیدتر بودیم.

بررسی‌های انجام شده در این تحقیق بر روی بافت رحم و تخمدان نشان می‌دهد که داروی کربوپلاتین بر تعداد فولیکول‌های بدوی، ثانویه و گراف گروه‌های تجربی تأثیر منفی داشته و نسبت به گروه‌های کنترل و شام کاهش معنی‌دار یافته است، همچنین باعث افزایش معنی‌دار تعداد فولیکول‌های آترتیک گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل و شام شد. میزان هورمون‌های استرادیول و FSH گروه‌های تجربی نیز نسبت به گروه کنترل و شام در این پژوهش کاهش معنی‌داری را نشان داد.

در سال ۱۳۶۹ رُزنیزگ و همکارانش خصوصیات آنتی‌توموری بعضی از ترکیبات پلاتینیوم را کشف کردند [۱۸] در سال ۱۹۹۲، Petra Kopf-Maier در دپارتمان آناتومی دانشگاه برلین اثر کربوپلاتین را در مورفولوژی بافت بیضه

هم که شباهت زیادی به سیس پلاتین دارد، باعث کاهش تعداد فولیکول‌های بدوی ذخیره شده در گروه‌های تجربی شد. بررسی‌های انجام شده بر سطح سرمی هورمون FSH و استرادیول نشان می‌دهد که سطح سرمی این دو هورمون در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل و شم کاهش معنی‌داری یافته است. همچنین شاهد افزایش معنی‌دار فولیکول‌های آترتیک و کاهش تعداد فولیکول‌های سالم گروه‌های تجربی نسبت به کنترل و شم بودیم. این یافته‌ها با نتایج تحقیقاتی که توسط خانم هلال در سال ۲۰۱۴ در مصر انجام گرفت، مطابقت دارد. در این تحقیق اثر دو داروی کربوپلاتین و پاکلی تاکسل به صورت ترکیبی بر روی تخمدان و فولیکول‌های آن در رت نژاد ویستار بررسی شد. کربوپلاتین و پاکلی تاکسل به عنوان داروهای ترکیبی در بسیاری از سرطان‌ها به خصوص سرطان تخمدان استفاده می‌شود. تزریق این داروها سطح سرمی گنادوتروپین و هورمون‌های استروئید را به طور چشمگیری کاهش می‌دهد و باعث افزایش آپوپتوز سلولی می‌شود. همچنین درصد نابودی و از بین رفتن DNA بعد از درمان ترکیبی با این دو دارو در گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه کنترل افزایش زیادی یافت. تعداد فولیکول‌های سالم کاهش یافت و همینطور افزایش چشمگیر در تعداد فولیکول‌های آترتیک دیده شد. مکانیسم اثر سمیت داروها باعث کاهش سطح ترشح گنادوتروپین‌ها از هیپوفیز و همین‌طور تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن شد که این دو تغییر با کاهش تعداد فولیکول‌های سالم و افزایش فولیکول‌های آترتیک مرتبط و بر روی آن‌ها تاثیرگذار بود [12]. اگرچه ایده آل این است که با هدف به حداقل رساندن عوارض جانبی، رژیم‌های شیمی درمانی تا جایی که ممکن تعدیل شوند ولی باید به خاطر داشت مهمترین هدف در چنین شرایطی حداکثر کردن میزان بهبودی و درمان است و برخورد اولیه در برابر عوارض تخمدانی در زمینه شیمی درمانی شامل سرکوب عملکرد تخمدان و روش‌های جایگزین جهت بارداری است. پزشکان درمان‌کننده باید نقش بسیار فعالی در کاهش عوارض درازمدت تخمدانی به هر روش ممکن داشته باشند و اطلاعات کافی برای بیمار جهت انتخاب روش مناسب

در پژوهشی دیگر که در سال ۲۰۰۴ توسط آلوِس و همکارانش انجام گرفت نشان داده شد که نتایج در دختران و زنان جوانی که به علت لوسمی و تومورهای توپر تحت رژیم‌های شیمی درمانی قرار گرفته‌اند متفاوت است. در یک پژوهش بر روی ۳۵ دختر پیش و پس از بلوغ مبتلا به لوسمی که درمان‌های مختلفی دریافت کرده بودند، فقط سه مورد دچار هیپوگنادیسم اولیه در مدت متوسط ۴۹ ماه پس از درمان شدند [۲]. همانطور که توضیح داده شد در تحقیق حاضر نیز شاهد هیپوگنادیسم در گروه‌های تجربی نسبت به کنترل و شم بودیم. در مقاله‌ای دیگر که توسط T. G. Borovskaya و همکارانشان در سال ۲۰۰۴ انجام گرفت مورفولوژی و عملکرد تخمدان‌های موش رت در اوایل و اواخر بعد از تجویز پلاتین سائتوستاتیک بررسی شد. آزمایش بر روی موش‌ها نشان داد که سیس پلاتین و کربوپلاتین تغییرات مورفولوژیکی مشابه‌ای در تخمدان‌ها دارند. هر دو عامل باعث کاهش تعداد عناصر ساختاری و عملکردی می‌شوند. تغییرات مورفولوژیکی مشاهده شده در اوایل دوره پس از تزریق با طولانی شدن سیکل تولیدمثلی همراه بود که در موش‌های رت تحت درمان با کربوپلاتین طولانی‌تر بود و نازایی جزئی و قابل برگشت در ماده‌ها در اوایل دوره پس از درمان با سیس پلاتین مشاهده شد. غدد جنسی زن اهداف اصلی فعالیت‌های سمی داروهای ضد تومور هستند. نتایج اخیر در شیمی درمانی تومور نشون میده که مشکل نازایی ناشی از درمان سائتوستاتیک است [۴، ۷]. در بررسی‌های انجام شده در آزمایش کنونی نیز داروی کربوپلاتین غدد جنسی را مورد هدف قرار داده بود و تاثیرات چشمگیری بر روی آنها داشت. در دانشگاه از میر ترکیه در سال ۲۰۰۴ یک تیم تحقیقاتی به سرپرستی ونگ تاثیر شیمی درمانی با داروهای سیس پلاتین و پاکسی تاکسل را بر فولیکول‌های بدوی ذخیره شده در حیوان رت مورد بررسی قرار دادند و در نتیجه ی پژوهش آن‌ها مشخص شد که دوز بالای این داروها تاثیر زیادی بر فولیکول‌های بدوی داشته و باعث کاهش آن‌ها می‌شود [۲۳]. این یافته‌ها با نتایج ما مطابقت داشت، همانطور که داروی سیس پلاتین بر روی تعداد فولیکول‌های بدوی اثر منفی داشته، داروی کربوپلاتین

- for acute lymphoblastic leukemia. *Revista do Hospital das Clínicas*, 59(2), 67-70.
- [3] Bolis, G., Danese, S., Tateo, S., Rabaiotti, E., D'AGOSTINO, G., Merisio, C., ... & Parazzini, F. (2006). Epidoxorubicin versus no treatment as a consolidation therapy in advanced ovarian cancer: results from a phase II study. *International Journal of Gynecological Cancer*, 16 (S1), 74-78.
- [4] Borovskaya, T. G., Goldberg, V. E., Fomina, T. I., Pakhomova, A. V., Kseneva, S. I., Poluektova, M. E., & Goldberg, E. D. (2004). Morphological and functional state of rat ovaries in early and late periods after administration of platinum cytostatics. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 137 (4), 331-335.
- [5] Canetta, R., Bragman, K., Smaldone, L., & Rozenzweig, M. (1988). Carboplatin: current status and future prospects. *Cancer treatment reviews*, 15, 17-32.
- [6] Du Bois, A., Lück, H. J., Meier, W., Adams, H. P., Mobus, V., Costa, S., ... & Olbricht, S. (2003). A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(17), 1320-1329.
- [7] El-Cheikh, J., Vazquez, A., Crocchiolo, R., Furst, S., Calmels, B., Castagna, L., ... & Faucher, C. (2012). Acute GVHD is a strong predictor of full donor CD3+ T cell chimerism after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *American journal of hematology*, 87(12), 1074-1078.
- [8] Gore, M. E., Fryatt, I., Wiltshaw, E., & Dawson, T. (1990). Treatment of relapsed carcinoma of the ovary with cisplatin or carboplatin following initial treatment with these compounds. *Gynecologic oncology*, 36(2), 207-211.

برای حفظ توان باروری را فراهم کنند. در این باره همکاری گروهی از متخصصین انکولوژی و ناباروری می‌تواند بسیار مفید واقع شود. پیشرفت‌های جدید در مسیر حفظ باروری، امیدهای تازه‌ای را پیشروی نجات یافتگان سرطان که در حال حاضر به یانسگی زودرس مبتلا شده‌اند گذاشته است. با این حال تفاوت‌ها از یک بیمار تا بیمار دیگر مشکل ساز است و انجام پژوهش‌های بیشتر را ضروری می‌سازد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق داروی کربوپلاتین بر روی تعداد فولیکول‌های بدوی، ثانویه، گراف تاثیر منفی داشت و همچنین باعث افزایش فولیکول‌های آترتیک در گروه‌های تجربی شد که این تغییرات موجب کاهش ذخایر فولیکول‌ها و پیری زودرس و نارسایی تخمدان می‌شود. میزان هورمون استرادیول که یک هورمون زنانه است و برای شناسایی کاهش کمیت و کیفیت تخمک‌ها حائز اهمیت می‌باشد، در این پژوهش در گروه‌های تجربی نسبت به دو گروه کنترل و شم کاهش چشمگیر داشت که خود باعث اختلال در سیستم هورمونی شده و بر باروری موش‌ها اثر منفی می‌گذارد. همین‌طور هورمون FSH نیز که هورمون محرک فولیکول است و به سیکل قاعدگی و تولید تخمک در تخمدان‌ها کمک می‌کند و نشان دهنده ذخیره تخمک زن است، در گروه‌های تجربی کاهش یافت. بنابراین طبق نتایج به دست آمده، داروی کربوپلاتین بر روی بافت تخمدان و رحم موش‌ها موثر بوده و باعث مرگ سلولی در فولیکول‌های تخمدانی می‌شود.

منابع

- [۱] ریان، کنث جی، برکویتز، رزوباریری، رابرت ال. اصول بیماری‌های زنان کیستتر، ترجمه دکتر بهرام قاضی جهانی و همکاران، جلد اول و دوم، تهران: اشارت، چاپ دوم، زمستان ۱۳۷۴.
- [2] Alves, C. H. B. D. S., Kuperman, H., Dichtchekian, V., Damiani, D., Della Manna, T., Cristófani, L. M., ... & Setian, N. (2004). Growth and puberty after treatment

- [9] Hakes, TB, Chalas, E., Hoskins, WJ, Jones, WB, Markman, M., Rubin, SC, ... & Lewis Jr, JL (1992). Randomized prospective trial of 5 versus 10 cycles of cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin in advanced ovarian carcinoma. *Gynecological Oncology*, 45 (3), 284-289.
- [10] Harland, S. J., Newell, D. R., Siddik, Z. H., Chadwick, R., Calvert, A. H., & Harrap, K. R. (1984). Pharmacokinetics of cis-diammine-1, 1-cyclobutane dicarboxylate platinum (II) in patients with normal and impaired renal function. *Cancer research*, 44(4), 1693-1697.
- [11] Harrap, K. R., Jones, M., Wilkinson, C. R., Clink, H. M., Sparrow, S., Mitchley, B. C., ... & Veasey, A. (1980). Antitumor, toxic and biochemical properties of cisplatin and eight other platinum complexes. In *Cisplatin* (pp. 193-212).
- [12] Helal, M. A. L. (2014). Chemotherapeutic agent-Induced ovarian gonadotoxicity. *J Exper Biol Agric Sci*, 2, 583-591.
- [13] Köpf-Maier, P. (1992). Effects of carboplatin on the testis. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 29(3), 227-235.
- [14] Markman, M., Rothman, R., Hakes, T., Reichman, B., Hoskins, W., Rubin, S., ... & Lewis Jr, J. L. (1991). Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. *J Clin Oncol*, 9(3), 389-393.
- [15] Ozols, R. F., Bundy, B. N., Greer, B. E., Fowler, J. M., Clarke-Pearson, D., Burger, R. A., ... & Baergen, R. (2003). Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*, 21(17), 3194-3200.
- [16] Pandey, A., Bhosale, B., Pandita, V., Singh, A., Ghosh, J., Ghosh, J., & Bajpai, J. (2014). Carboplatin hypersensitivity in relapsed ovarian carcinoma: A therapeutic challenge. *Indian journal of medical and paediatric oncology: official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology*, 35(1), 17.
- [17] Rose, WC, Shabby, JE, Huftalen, JB, & Bradner, WT (1982). Antitumor activity and toxicity of cisplatin analogs. *Cancer treatment reports*, 66 (1), 135-146.
- [18] Rosenberg, B., Vancamp, L., TROSKO, JE, & MANSOUR, VH (1969). Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*, 222 (5191), 385.
- [19] Saoji VA. Premature ovarian failure due to cyclophosphamide: a report of four cases in dermatology practice. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*. 2008 Mar 1; 74(2): 128.
- [20] Terheggen, PMAB (1990). Interaction of cisplatin and carboplatin with cellular DNA. *PHARMACEUTICAL WEEK SHEET SCIENTIFIC EDITION*, 12 (3), 119-120.
- [21] Tomlinson, M., Meadows, J., Kohut, T., Haoula, Z., Naeem, A., Pooley, K., & Deb, S. (2015). Review and follow-up of patients using a regional sperm cryopreservation service: ensuring that resources are targeted to those patients most in need. *Andrology*, 3(4), 709-716.
- [22] Von Hoff, D. D., & Rozenzweig, M. (1979). cis-Diamminedichloroplatinum (II): a metal complex with significant anticancer activity. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 16, pp. 273-298). Academic Press.
- [23] Wang, T. H., Wang, H. S., & Soong, Y. K. (2000). Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 88 (11), 2619-2628.

Investigation the effect of carboplatin on oogenesis and uterus changes in adult female NMRI mice strain

Gholami Yarahmadi S¹., Hayati Roodbari N.^{1*}, Parivar K¹., Vaezi Gh.²

¹ Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

* Email: nasimhayati@yahoo.com

Received: 16 October 2018

Accepted: 5 May 2019

Abstract

Cancer is one of the most common diseases around the world. The most important therapies for cancer are chemotherapy that is performed by various medications. One of the common drugs in chemotherapy is “Carboplatin”. In this study, the effects of Carboplatin on oogenesis and uterine changes in NMRI mouse strain have been investigated *In vivo*. In this study, 30 adult female mice were randomly divided into five groups: control, sham and three experimental groups. Experimental groups were injected Carboplatin with 0.36, 0.18, 0.09 mg/ml density for 28 days and all were injected subcutaneously. After describing the animals, the ovary and uterus were separated and subjected to histopathologic and stained by hematoxylin and eosin. Blood sampling was performed to study both estradiol and FSH. The results were analyzed using one-way ANOVA and SPSS software. By using Carboplatin, the number of primordial, secondary, Graafian follicles, corpus lutea and blood vessels decreased and the number of atretic follicles increased. The diameter of ovary in experimental groups decreased, but there was no significant change in diameters of follicles. Uterine studies showed that, the uterine’ diameter and layers, and the diameter of lumen reduced. In addition, the number of uterine glands decreased. Also, the levels of FSH and estradiol decreased. Regarding to using Carboplatin, this drug by decrease in the number of primordial, secondary and Graafian follicles, increase in number of atretic follicles, and also disruption of the hormonal system, the probability of premature aging may increase and has a negative effect on fertility.

Keywords: Carboplatin, oogenesis, uterine changes, ovarian follicles, NMRI mouse strain.