Physiology and Pharmacology, 15 (3), 351-360

Autumn 2011 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Effects of chronic low- dose treatment with cyclophosphamide on the rat testis

Akram Hosseini[1]*, Abbas Ahmadi[2], Firouz Ghaderi Pakdel[3], Samad Zare[1]

1. Dept. biology, school of Science, Urmia University, Urmia, iran
2. Dept. Emberyology, school of Veterinary, Urmia University, Urmia, iran
3. Dept. Physiology, school of Medical, Urmia university, Urmia, iran

Received: 1 May 2011 **Accepted: 4 Aug 2011**

Abstract

Introduction: Cyclophosphamide (CP) is used for the treatment of various cancers. In spite of its therapeutic importance, a wide range of adverse effects such as reproductive toxicity has been observed following the administration of this drug in human and experimental animals. In the current study, we have investigated the adverse effects of CP on morphology and histology of testis rats.

Methods: Twenty-one male Wistar rats were selected and randomly divided into 3 groups. CP was used at a dose of 6.1 mg/kg/day, (i.p.) for 50 days. At the end of the treatment, the histological and biochemical changes in testis, as well as sperm count and motility were assessed.

Results: Testicular weight, sperm count and motility as well as serum testosterone concentration were significantly decreased whereas malondialdehyde (MDA) level was significantly increased in CP group compared with those in the control and sham groups. In addition, histological studies of testis structure showed that seminiferous tubules of testis were severely damaged in the CP group. CP increased the number of sloughing tubules and interstitial space, while it decreased seminiferous tubular diameter (STD), seminiferous epithelial height (SE), tubule differentiation index (TDI) and spermiation index (SPI).

Conclusion: The results suggest that cyclophosphamide affect fertility parameters and cause testis atrophy after chronic treatment.

Key words: Chemotherapy, Cyclophosphamide, testis structure, sperm, rats

* Corresponding author e-mail: Hosseinia30@yahoo.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۵ (۳)، ۳۵۱ – ۳۶۰
پاییز ۱۳۹۰

فیزیولوژی و فارماکولوژی

اثرات مصرف طولانی دوز پائین سیکلوفسفامید بر بافت بیضه در موشهای صحرائی

اکرم حسینی[1*]، عباس احمدی[2]، فیروز قادری پاکدل[3]، صمد زارع[1]
۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ارومیه، ارومیه
۲. گروه جنین شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه
۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

دریافت: ۱۱ اردیبهشت ۹۰ پذیرش: ۱۳ مرداد ۹۰

چکیده

مقدمه: سیکلوفسفامید یک ترکیب شیمی درمانی است و برای درمان طیف وسیعی از سرطانها بکار گرفته می شود. علیرغم اهمیت دارویی گسترده، اثرات سوء فراوانی بر سیستم تناسلی می تواند داشته باشد. در این مطالعه ما اثرات مخرب سیکلوفسفامید را بر مورفولوژی و بافت شناسی بیضه در موشهای صحرائی بررسی کردیم.

روش ها: ۲۱ عدد موش رت نر بالغ نژاد ویستار بطور تصادفی در سه گروه هفت تایی تقسیم شدند. سیکلوفسفامید با دوز mg/kg/day ۶/۱ به مدت ۵۰ روز به روش درون صفاقی مورد استفاده قرار گرفت. در پایان دوره تیمار، تغییرات هیستولوژیکی و بیوشیمیائی بافت بیضه بعلاوه تعداد و تحرک سلولهای اسپرم ارزیابی شدند.

یافته ها: در گروه سیکلوفسفامید وزن بیضه، تعداد و تحرک اسپرم، غلظت تستوسترون پلاسما در مقایسه با گروه کنترل و کنترل شم بطور معنی داری کاهش یافت در حالیکه سطح مالون دی آلدئید بطور معنی داری افزایش نشان داد. مطالعات هیستولوژیکی بافت بیضه بیانگر این است که در گروه سیکلوفسفامید لوله های منی ساز به شدت آسیب دیده است. سیکلوفسفامید ریزش سلولهای زایا و فضای بینابینی را افزایش و قطر، ضخامت، ضریب تمایز و اسپرمیوژنز در لوله های منی ساز را کاهش داد.

نتیجه گیری: مصرف بلند مدت سیکلوفسفامید بر پارامترهای باروری اثر کرده و موجب آتروفی بافت بیضه می شود.

واژه‌های کلیدی: شیمی درمانی، سیکلوفسفامید، بافت بیضه، اسپرم، رت

مقدمه

شیمی درمانی یکی از شیوه های رایج معالجه انواع سرطانها است. بکار گرفتن برخی داروها و ترکیبات شیمیایی برای کنترل و مهار سلولهای سرطانی در اصطلاح پزشکی شیمی درمانی تعریف می شود [۱۳]. این ترکیبات با ممانعت از پلیمریزاسیون میکروتوبولهای سازنده دوک میتوزی تکثیر مهار گسیخته و سریع سلولهای سرطانی را کند و متوقف می سازد. شیمی درمانی اغلب سلول هایی را که دائماً در حال تکثیرهستند، مورد هدف قرار می دهد. بنابراین سلول های جنسی موجود در بافت بیضه که پیوسته در حال تقسیم و تمایزهستند هدف مناسبی برای چنین ترکیباتی محسوب می شوند [۲۲]. معمولاً به دنبال تجویز یک داروی ضد سرطان، اثرات آسیب رسان سلولی آن به شکل مستقیم بر روی اپتیلیوم سلول های جنسی دیده می شود. آسیب دیدگی غدد جنسی به صورت دائمی و یا طولانی مدت از عوارض جانبی معمول داروهای ضدسرطان در مردان بیمار محسوب می شود که می تواند منجر به الیگواسپرمی و یا

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: Hosseinia30@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

آزواسپرمی شود [۱۲]. در بین این عوامل، داروهایی که دارای خواص آلکیله کنندگی هستند، بیشترین اثرات سوء را روی بیضه ایجاد می کنند [۲۳].

سیکلوفسفامید که به طور معمول به عنوان داروی ضد سرطان و نیز سرکوب کنندهٔ ایمنی به کار می رود، دارای خاصیت آلکیلاسیون است و قادر به برقراری پیوندهای کووالانسی در جایگاههای نوکلئوفیلیک رشته های DNA، RNA و پروتئین و ایجاد پیوندهای عرضی بوده که نهایتا منجر به شکستگی و غیر فعال شدن رشته های DNA، توقف در سنتز آنها، مهار تکثیر سلولی، شکل گیری ریز هسته ها و نهایتا مرگ سلولی می شود [۲۰]. این دارو در سال ۱۹۵۸ سنتز و برای درمان تومور بکار گرفته شد و امروزه به شکل گسترده ای در دارو درمانی انسانها کاربرد دارد [۶]. علی رغم کاربردهای وسیع کلینیکی، سیکلوفسفامید موجب بروز اثرات جانبی زیادی از جمله سمیت تولید مثلی درموجوداتی که در معرض این دارو قرار می گیرند، می شود [۳،۲۲]. متابولیسم سیکلوفسفامید در کبد صورت می گیرد. این ترکیب تحت تاثیر آنزیمهای میکرزومی موجود در کبد تجزیه شده و به متابولیتهای فعال خود یعنی فسفورآمیدموستارد و آکرولئین تبدیل می شود [۲۶]. فسفورآمیدموستارد مسئول خواص ضد سرطانی این دارو است در حالیکه آکرولئین با تداخل در سیستم دفاعی آنتی اکسیدانتی بافتها [۴] و تولید مقدار زیادی رادیکال آزاد اکسیژن دارای خوای موتاژنی می باشد [۲۸].

مکانیسم عمل سیکلوفسفامید در ایجاد سمیت بیضوی بطور کامل شناخته نشده اما مطالعات زیادی نشان می دهند که سیکلوفسفامید تعادل احیاگر بافتها را بهم می زند و با افزایش استرس اکسیداتیو باعث تغییرات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و هیستولوژیکی می شود [۹،۱۸،۱۹]. معمولا داروهای شیمی درمانی همانند سیکلوفسفامید بصورت ترکیبی با داروهای دیگر بکار گرفته می شود. برخی از اثرات جانبی معمول سیکلوفسفامید عبارتست از: سرکوب مغز استخوان، استفراغ، تهوع، ریزش مو و کچلی، سیستیت هموراژیک و ناباروری [۱۶].

در پیشینه مطالعاتی این دارو گزارشات چندانی مبنی بر اثرات سمی سیکلوفسفامید به تنهایی بر بیوپسی و هیستوپاتولوژی بافت بیضه در انسان در دسترس نمی باشد. اثر دوز بالای سیکلوفسفامید بصورت حاد و مزمن بر اسپرم حیوانات آزمایشگاهی و میزان باروری آنها مطالعه شده است [۱۴]. مطالعه بر روی حیوانات آزمایشگاهی نشان می دهد که مصرف دوز پائین این دارو دارای اثرات سوء بر بافتهای بدن از جمله کیسه مثانه است [۳۲]. از آنجائی که معمولا اثرات سوء ترکیبات شیمیایی بر عملکرد دستگاه تولید مثل در حیوانات آزمایشگاهی مطالعه می شود، ما هم در این تحقیق بر آن شدیم تا اثر مصرف طولانی مدت داروی سیکلوفسفامید را به تنهائی و با دوز پائین بر دستگاه تناسلی موش صحرائی نر بررسی کنیم. ارزیابی تغییرات وزن بدن و بیضه، مطالعات بافتی بیضه، تعداد اسپرم و تحرک آنها از جمله پارا مترهایی است که در چنین مطالعاتی ارزیابی می شوند [۳۳]. در این مطالعه هم اثرات سیکلوفسفامید بر ویژگیهای ماکروسکوپیک (اندازه گیری وزن و حجم) و میکروسکوپیک (مورفومتریک و مورفولوژیک) بافت بیضه و برخی از پارامترهای فوق مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

در این تحقیق از ۲۱ عدد موش صحرائی نر بالغ از نژاد Wistar در محدوده وزنی ۳۰±۲۲۰ گرم جهت انجام آزمایشات استفاده گردید. حیوانات در مرکز نگهداری و پرورش حیوانات آزمایشگاهی گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه تحت شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و درجه حرارت (۲ ± ۲۲°C) در قفسهای مخصوص پرورش و نگهداری شدند. این حیوانات توسط پلیت مخصوص حیوانات آزمایشگاهی تغذیه کرده و جهت آبدهی از آب شیر معمولی استفاده شد. در طول دوره تیمار حیوانات آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. پروتکل این پروژه بر اساس قوانین بین المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید و در کمیته اخلاقی دانشگاه به تصویب رسید.

بررسی مطالعات پیشین بر روی سیکلوفسفامید نشان می دهد که تیمار کرونیک سیکلوفسفامید با دوز mg / kg / day ۶/۱ باعث القاء سمیت در یاخته ها می شود [۳۲] و از آنجائیکه دوره کامل اسپرماتوژنز در رت حدود ۴۸ روز طول می کشد [۳۶]، بنابراین میزان دوز تجویزی mg / kg / day ۶/۱ انتخاب شد که به مدت ۵۰ روز از طریق تزریق درون

صفاقی اجرا گردید.

گروه بندی حیوانات و روش انجام آزمایش: ۲۱ عدد موش صحرائی نر به صورت تصادفی در سه گروه ۷ تایی تقسیم شدند. گروه تجربی؛ حیوانات در این گروه دارو سیکلوفسفامید را از طریق تزریق داخل صفاقی در طول دوره تیمار دریافت کردند. گروه کنترل شم؛ که حلال دارو (نرمال سالین) را بصورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند و در آخر گروهی تحت عنوان گروه کنترل بخاطر حذف اثر استرس ناشی از تزریق در نظر گرفته شد. در این گروه هیچ نوع تزریقی انجام نشد و حیوانات فقط آب و غذا دریافت کردند.

بعد از گروه بندی حیوانات، تنظیم کردن سیکل نوری، استاندارد کردن محیط و سازش پذیری حیوانات با شرایط استاندارد محیطی به مدت دو هفته، هر گروه از موشها تحت رژیم دارویی فوق قرار گرفتند. در پایان دوره تیمار، حیوانات توسط اتر بیهوش و با بریدن گردن کشته شدند. خون آنها در لوله های آزمایش کاملاً تمیز و خشک حاوی EDTA جمع آوری و به مدت ۲۴ ساعت جهت سنجش غلظت هورمون تستوسترون در یخچال نگهداری شدند. با ایجاد برش در ناحیه شکم، اپیدیدیم و بیضه ها از بدن خارج و پس از جداسازی بافت چربی اطراف آنها، با استفاده از کولیس و ترازوی دقیق دیجیتالی قطر (طول و عرض) و وزن بیضه ها در هر یک از موشها بطور جداگانه اندازه گیری و ثبت گردید. از بخش دمی اپیدیدیم ها جهت ارزیابی برخی از پارامترهای اسپرم استفاده شد. محاسبه حجم بیضه ها از رابطه زیر انجام شد:

$$V= (d^2 \times \pi /4)\, L \times K$$

در این رابطه V حجم بیضه، d قطر کوچک ببیضه، L قطر بزرگ بیضه، π =۳/۱۴ و K= ۰/۹ (ضریب ثابت) می باشند [۸].

پس از مشاهدات ماکروسکوپیک، بیضه ها جهت مطالعات بافت شناسی در فیکساتیو (فرمالین۱۰٪ نمکی) قرارگرفتند. بعد از تثبیت نمونه ها، مراحل آماده سازی بافتها جهت برشهای پارافینی بصورت زیر انجام گرفت: آب گیری در الکلهای صعودی، شفاف سازی در روغن سدر و گزیلول، آغشته سازی و قالب گیری با پارافین و در انتها از بلوک های پارافینی به دست آمده برشهای ۶ میکرونی تهیه شد. مقاطع تهیه شده به طریق هماتوکسیلین – ائوزین رنگ آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به عدسی مدرج مورد بررسی قرار گرفتند. پارامترهای ارزیابی شده در مقاطع بافتی تهیه شده عبارتند از: اندازه گیری قطر کوچک و بزرگ لوله های منی ساز در مقاطع عرضی لوله ها، اندازه گیری ضخامت اپیتلیوم ژرمینال لوله های منی ساز، ضریب تمایز لوله ای و میزان اسپرمیوژنز.

بخش دمی اپیدیدیمها بعد از خارج شدن از بدن در ۵ ml محیط کشت Ham's F10، توسط قیچی قطعه قطعه و به آرامی در داخل انکوباتور CO_2 قرارگرفتند تا اسپرمهای موجود در آن آزاد و در محیط به صورت شناور درآیند.

جهت بررسی تحرک اسپرماتوزوئیدها، یک قطره از سوسپانسیون تهیه شده فوق بر روی یک لام مخصوص قرار گرفت و با لامل روی آن پوشانده شد. تعداد اسپرمهای متحرک را نسبت به کل اسپرمهای موجود در زیر میدان دید با درشت نمائی ۴۰۰ محاسبه و چند بار تکرار و در پایان میانگین محاسبه گردید. جهت شمارش اسپرم، ۵ µl از سوسپانسیون فوق توسط ۹۵ µl محیط کشت رقیق شد. یک قطره از سوسپانسیون رقیق شده بر روی لام نئوبار منتقل و بعد از ۵ دقیقه سرهای اسپرم در زیر میکروسکوپ نوری با درشت نمائی۰ ۴۰ شمارش شدند [۴۱].

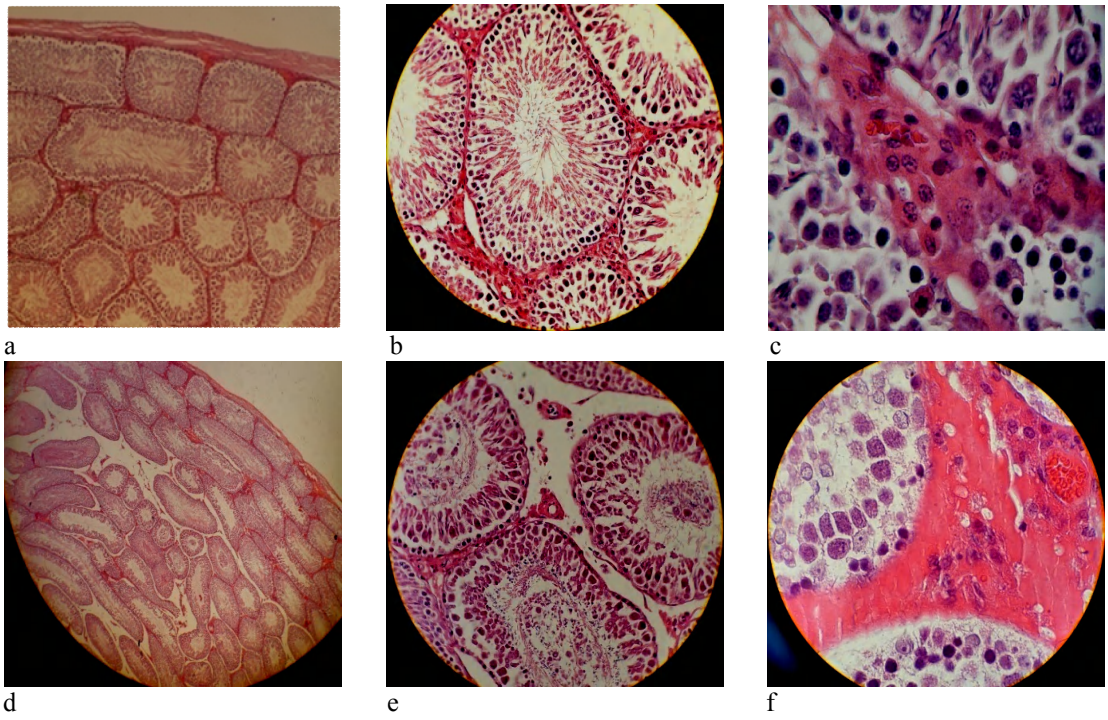
میزان استرس اکسیداتیو از طریق ارزیابی میزان پراکسیداسیون چربی در بافت هموژن شدهٔ بیضه مشخص گردید. در طی مسیر پراکسیداسیون لیپیدی چندین محصول تولید می شود که مهمترین آنها مالون دی آلدئید (MDA) است. اندازه گیری غلظت (MDA) به عنوان شاخص میزان پراکسیداسیون در بافتها صورت می گیرد. مالون دی آلدئید با تیو باربی توریک اسید واکنش داده و تولید یک محصول رنگی می کند که جذب نوری محلول حاصل در طول موج ۵۳۵ نانومتر خوانده شد [۱۵].

سطح تستوسترون پلاسما با استفاده از متد الکترو کمی لومینسانس و با استفاده از کیتهای موجود اندازه گیری شد و نتایج بصورت ng TST/dl در پلاسما ارائه گردید. یافته های جمع آوری شده با استفاده از نرم افزارGB STAT مورد تحلیل قرار گرفتند. جهت ارزیابی تفاوت معنی دار بین گروهها از تست تعقیبی Tukey استفاده شد. یافته ها به صورت میانگین و انحراف معیار بیان و مقادیر ($P<۰/۰۱$) از لحاظ آماری معنی دار تلقی شدند.

یافته ها

نتایج جمع آوری شده در این تحقیق در جداول ۱ تا ۴ گزارش شده است. یافته های حاصل کاهش در وزن و حجم بیضه در گروه سیکلوفسفامید را نشان می دهد. کاهش وزن در این گروه در مقایسه با گروه کنترل و کنترل شم، معنی دار است (P<۰/۰۱) اما کاهش در حجم بیضه بین گروه سیکلوفسفامید و گروه های کنترل و کنترل شم از نظر آماری معنی دار نیست (جدول ۱).

یافته های میکروسکوپی بافت بیضه نشان می دهند قطر



شکل ۱- مقاطع عرضی از بافت بیضه در گروه های کنترلی و گروه سیکلوفسفامید. رنگ آمیزی H&E .

a: نمایی از بافت بیضه در گروه کنترل که در آن کپسول بیضه و لوله های منی ساز دیده می شود و نشان می دهد که بافت بیضه دارای انسجام طبیعی خود می باشد. (درشت نمایی ۴۰ X).

b: نمایی از ارتباط تنگاتنگ بین لوله های منی ساز و رده سلولهای اسپرماتوژنز در اپیتلیوم لوله ها در گروه کنترل مشاهده می شود. (درشت نمایی ۱۰۰X).

C: نمایی از لوله منی ساز و بافت بینابینی بین آنها در گروه کنترل. (درشت نمایی ۴۰۰X).

d: نمایی از بافت بیضه در گروه سیکلوفسفامید که در آن کپسول بیضه و لوله های منی ساز دیده می شود و نشان می دهد که بافت بیضه انسجام طبیعی خود را از دست داده و فاصله بین لوله های منی ساز بیشتر شده و قطر لوله های منی ساز کمتر شده و بافت همبند بین آنها افزایش یافته است. (درشت نمایی ۴۰ X).

e: نمایی از بافت بیضه در گروه سیکلوفسفامید که نشان میدهد قطر لوله های اسپرم ساز کمتر بوده لذا در بین لوله ها فاصله دیده می شود و انسجام بین لوله ها از بین رفته و اسپرماتوژنز دچار تخریب شده است. (درشت نمایی۴۰ X).

f: در گروه سیکلوفسفامید ادم در اطراف رگ خونی روئیت می گردد که واکوئله بوده و ادم به بین لوله های اسپرم ساز نیز گسترش یافته است. سلول های لیدیگ که به شکل پراکنده در بافت همبندی بینابینی دیده می شوند. (درشت نمایی ۴۰۰ X).

جدول ۱- نتایج بدست آمده از بررسی تاثیر سیکلوفسفامید بر بافت بیضه در گروه های تحت تیمار. مقادیر جدول Mean±SEM می‌باشد. * مقادیر از لحاظ آماری نسبت به گروه های کنترل معنی دار هستند (p < ۰/۰۱).

	Testis weight(gr)	Testis volum (cm^3)
Con	1.47±0.05	1.540±0.15
Con (sham)	1.52 ±0.22	1.537±0.24
Cp	1.22±0.09*	1.532±0.72

Con: control; con (sham): control sham; Cp: cyclophosphamide.

جدول ۲- نتایج بدست آمده از مطالعات هیستوپاتولوژیک در بیضه و بررسی تاثیر سیکلوفسفامید در بافت بیضه گروه های تحت تیمار.
TDI: ضریب تمایز لوله ای، SPI: ضریب اسپرمیوژنز، STD: قطر لوله های منی ساز، SE: ضخامت اپیتلیوم. مقادیر جدول Mean±SEM می‌باشد. * مقادیر از لحاظ آماری نسبت به گروه های کنترل معنی دار هستند ($p < ۰/۰۱$).

	STD(µm)	SE (µm)	TDI(%)	SPI(%)
Con	39.79±259.14	5.65±51.22	2.58±93.85	3.08±90
Con (sham)	11.32±264.86	5.08±48.28	2.97±94.28	2.85±92.85
Cp	9.72*±206.21	2.50 *±29.47	3.40*±61.42	3.40*±48.57

Con: control; con (sham): control sham; Cp: cyclophosphamide.

جدول ۳- نتایج بدست آمده از بررسی تاثیر سیکلوفسفامید بر کیفیت اسپرم در گروه های تحت تیمار. مقادیر جدول **Mean±SEM** می‌باشد. * مقادیر از لحاظ آماری نسبت به گروه های کنترل معنی دار هستند ($p < ۰/۰۱$).

	Motility (٪)	Count (10^6/ ml)
Con	77±4.97	249.37±35.51
Con (sham)	76.75 ±4.34	238.8 ±45.35
Cp	57.75±3.57 *	130.5±20.41*

جدول ٤- نتایج بدست آمده از بررسی تاثیر سیکلوفسفامید بر میزان پراکسیداسیون بافت بیضه و غلظت تستوسترون در گروه های تحت تیمار. مقادیر جدول Mean±SEM می‌باشد. * مقادیر از لحاظ آماری نسبت به گروه های کنترل معنی دار هستند ($p < ۰/۰۱$).

	Testis LPO (µmol/ml)	Testosterone (ng/dl)
Con	0.081±0.03	2.25±0.149
Con (sham)	0.072±0.02	2.28±3.18
Cp	1.135±0.08*	0.70±0.37*

لوله های منی ساز در گروه سیکلوفسفامید در مقایسه با گروه کنترل و کنترل شم بطور معنی داری کاهش یافت ($P<۰/۰۱$) (جدول ۲). در گروه کنترل و کنترل شم لوله های منی ساز بطور فشرده و منظم در کنار هم قرار دارند (شکل۱- a,b,c)، اما در گروه سیکلوفسفامید فضای بین لوله های منی ساز (بافت بینابینی) افزایش یافته و حاوی بافت همبند بیشتر، واکوئلهای متعدد و تعداد زیادی ماکروفاژ هستند. همچنین بررسی اپیتلیوم لوله های منی ساز بیانگر کاهش معنی داری در ضخامت اپیتلیوم (Epithelial height) SE، قطر لوله های منی ساز (Seminiferous tubular diameter) STD، تعداد رده های سلولی (Tubule differentiation) (TDI%) index و تعداد اسپرماتوزوئید ها (Spermiation index) (SPI%) در حیوانات گروه سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل و کنترل شم است ($P<۰/۰۱$) (جدول ۲). در اکثر لوله های منی ساز درگروه سیکلوفسفامید یک نوع بی نظمی و بهم ریختگی سلولی (ریزش) در اپیتلیوم مشاهده شد که به نظر می رسد این اختلالات به علت از بین رفتن اتصالات بین سلولی است (شکل۱-d). علاوه بر این سلولهای لایدیگ در بیضه این گروه از حیوانات دچار آتروفی شده و دژنراسیون یافتند. هسته برخی از آنها حالت کروماتولیز و پیکنوزه نشان می دهد. سیتوپلاسم این سلولها واکوئله شده و حالت یکدستی خود را از دست داده و در بافت بینابینی به فرم پراکنده ای درآمده اند (شکل۱- d,e,f). در گروه کنترل و کنترل شم هسته های سلولهای سرتولی در قاعده لوله های منی ساز قرار دارند اما در گروه تیمار شده با سیکلوفسفامید هسته ها شکل نامنظمی به خود گرفته و به طرف حفره میانی لوله های منی ساز کشیده شده اند.

آنالیز داده ها نشان می دهد بدنبال تجویز سیکلوفسفامید

تعداد اسپرم‌های اپیدیدیمی، تحرک آنها و غلظت هورمون تستوسترون در مقایسه با گروه کنترل و کنترل شم بطور معنی‌داری کاهش می یابد (P< ۰/۰۱) (جدول ۳و۴). از طرفی در این گروه از حیوانات میزان پراکسیداسیون چربی در بافت بیضه نسبت به گروه های کنترل و کنترل شم افزایش معنی داری نشان می دهد (P< ۰/۰۱) (جدول ۴).

همانطور که جداول نشان می دهند تفاوت چندانی بین گروه کنترل و کنترل شم در کلیه پارامترهای بررسی شده دیده نمی شود. لذا می توان گفت استرس ناشی از تزریق بر نتایج جمع آوری شده تاثیری ندارد (جدول ۱-۴).

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد که درمان با سیکوفسفامید منجر به القاء سمیت در دستگاه تناسلی نر می شود. درمان با دوز پائین سیکلوفسفامید، به مدت ۵۰ روز باعث آسیبهای شدید بافتی، کاهش معنی دار در ضریب تمایز لوله ای و میزان اسپرمیوژنز می شود. میزان پراکسیداسیون، تعداد لوله های به هم ریخته و فضای بینابینی دربافت بیضه افزایش می یابد. این تغییرات با کاهش تعداد و تحرک اسپرم، غلظت هورمون تستوسترون، وزن و حجم بیضه همراه است. سیکلوفسفامید و متابولیتهای سازنده آن باعث القاء استرس اکسیداتیو در بافتها می شوند [۳]. عدم تعادل بین تولید ROS و فعالیتهای اکسیژن زدا، باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در مایع سیمن می شود که ارتباط نزدیکی با اختلالات دستگاه تناسلی دارد [۲،۳۵]. مقادیر اندک ROS نقش مهمی در فرآیندهای حیاتی سلولهای اسپرم دارد اما غلظتهای بالای آن هم می تواند باعث آسیبهای جبران ناپذیری در سلولهای اسپرم شود. میزان پائین آنزیم های آنتی اکسیدان در سیتوپلاسم سلولها و وفور اسیدهای چرب غیر اشباع در غشا پلاسمائی سلولهای اسپرم، این سلولها را در برابر آسیبهای ناشی از ROS بسیار مستعد می سازد [۱۷،۴۳].

مقاطع بافتی بیضه که از گروه های مورد آزمایش بدست آمد، توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. دیواره لوله های منی ساز توسط سلولهای جنسی و سلولهای سرتولی مفروش شده است. سلولهای سرتولی تنها سلولهای سوماتیک موجود در لوله های منی ساز هستند و نقش مهمی در تکامل و پشتیبانی سلولهای جنسی دارند. اتصالات محکم بین سلولهای سرتولی مجاور هم باعث تشکیل سد خونی – بیضوی می شود. با ریزش سلولهای جنسی به داخل لوله های منی ساز در گروههای تحت درمان با سیکلوفسفامید، عملکرد و ساختار سلولهای سرتولی مختل می شود. اختلال در سد خونی – بیضوی با بی نظمی سلولهای جنسی در لوله های منی ساز، جدا شدن سلولهای سرتولی از غشای پایه و ریزش سلولهای جنسی نابالغ به لومن بیضه همراه است. بنابراین هر تغییری در سلولهای سرتولی می تواند منجر به القاء ناهنجاری در عملکرد سلولهای لیدیگ، اسپرماتوژنز و اسپرمیوژنز شود [۲۹،۳۸]. در ضخامت اپی تلیوم لایه ژرمینال واکوئل هایی دیده می شود که این واکوئلها می تواند بخاطر تحلیل رفتن سلول های زایا، اتصالات بین سلولی و یا کاهش مولکول های چسبنده مانند کادهرینها باشند [۳۰]. مطالعات پیشین نشان می دهد که داروهای ضد سرطان مانند سیکلوفسفامید باعث القاء آپوپتوز در لوله های منی ساز می شود [۷]. این ترکیب با بر هم زدن تعادل بین آپوپتوز سلولی و تقسیمات سلولی باعث کاهش سلولهای اسپرماتوگونی و لایه ژرمینال می شود. با تخریب سلولهای اسپرماتوگونی، تعداد سلولهای ژرمینال کاهش می یابد. در نتیجه ضخامت اپیتلیوم لوله های منی ساز و میزان اسپرماتوژنز هم تحت تاثیر قرار می گیرند. با کاهش جمعیت سلولی بیضه می توان انتظار داشت که از قطر لوله های منی ساز کاسته شود، وزن و حجم بیضه هم کاهش یابند که یافته های ما هم این مطالب را تایید می کند.

کاهش در وزن بیضه ها می تواند به علت کاهش تعداد سلولهای جنسی، آتروفی سلولهای لیدیگ و سطح پایین و کاهش یافته اسپرماتوژنز باشد [۲۴]. همچنین این کاهش وزن ممکن است بخاطر کاهش در اندازه بیضه یا کاهش قطر لومن، لوله های منی ساز، ضخامت اپیتلیال و یا افزایش در فضای بین لوله ای باشد که نهایتا منجر به تخریب بیضه می شود [۱۱]. تمام این موارد با مطالعات هیستولوژیکی در این مطالعه مشاهده گردید. Zhengwei و همکارانش در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که ارتباط مستقیمی بین حجم بیضه و تعداد سلولهای ژرمینال وجود دارد [۴۳]. برخی از محققین معتقدند که افزایش حجم بافت بینابینی در بیضه می تواند یک واکنش جبرانی به دنبال

کاهش حجم بیضه باشد [۵،۳۷]. در مطالعه ما علیرغم افزایش وسعت بافت بینابینی در بیضه حیوانات گروه سیکلوفسفامید، حجم بیضه تغییر معنی داری نشان نداد. اثرات سمی داروهای شیمی درمانی مانند سیکلوفسفامید می تواند بطور مستقیم و یا غیر مستقیم و از طریق آسیب دیدگی اپیتلیوم سلولهای منی ساز، بر سلولهای لیدیگ اعمال شود [۲۱]. هورمون استروئیدی تستوسترون که نقش مهمی در تکامل و تمایز سلولهای اسپرم ایفا می کند، توسط سلولهای لایدیگ ترشح می شود. لذا با ریزش سلولهای جنسی و تخریب سلولهای سرتولی، سلولهای لایدیگ دچار آتروفی شده و میزان سنتز و ترشح تستوسترون کاهش می یابد.

آسیبهای اکسیداتیو ناشی از مصرف سیکلوفسفامید باعث کاهش فرآیندهای سلولی و استروئیدوژنز توسط سلولهای لایدیگ می شود [۲۵]. با کاهش تستوسترون فرآیند اسپرماتوژنز و میزان تکثیر سلولی هم که وابسته به این هورمون است، دچار اختلال می شود [۲۷،۳۴]. همچنین تمایز سلولهای زایا هم دچار نقصان شده و باعث کاهش در تعداد سلولهای اسپرم و رده های سلولی (TDI) می شود. مکانیسم احتمالی در اختلال سلولهای لیدیگ، افزایش رادیکالهای آزاد و بروز استرس اکسیداتیو می تواند باشد [۱۰]. نتایج این مطالعه هم نشان می دهد که با افزایش سطح ROS، میزان تولید و تمایز اسپرم در لوله های منی ساز حیوانات گروه سیکلوفسفامید کاهش می یابد.

قدرت تحرک اسپرمها به عنوان عامل تعیین کننده و موثر در باروری افراد مطرح می شود و متضمن لقاح موفقیت آمیزاست. بر اساس مطالعات پیشین به نظر می رسد در انجام فرآیند لقاح، تحرک اسپرم نقش موثرتری در مقایسه با سایر فاکتورها مانند تعداد و مورفولوژی اسپرم ایفا می کند [۴۲]. مطالعه حاضر نشان می دهد مصرف دوز پائین سیکلوفسفامید بطور طولانی مدت موجب کاهش درصد اسپرم های متحرک در محیط می شود. افزایش سطح ROS با ایجاد تغییر در سیستم آنزیمی سلولهای اسپرم، میزان پراکسیداسیون فسفولیپیدها را افزایش، سیالیت و تراوائی غشاء سلولها و تحرک اسپرم را کاهش می دهد [۱،۱۷]. همچنین تغییرات ناشی از پراکسیداسیون اجزاء غشاء اسپرمها منجر به کاهش فعالیت پمپ Na^+/K^+-ATPase و در نهایت افت شدید در قدرت تحرک سلولهای اسپرم می شود. به دنبال اختلال در فرایندهای تبادل یونی غشاء وآنزیم های دخیل در آن، در اثر تغییر تراوائی غشا، از میزان فعالیت و تحرک سلولهای اسپرم کاسته می شود [۳۹،۴۰].

با توجه به نتایج بدست آمده می توان چنین نتیجه گیری کرد که مصرف ترکیبات شیمی درمانی مانند سیکلوفسفامید جهت مهار سلولهای سرطانی، همراه با اثرات درمانی خود یکسری عوارض جانبی هم دارد. در طول شیمی درمانی سیستم آنتی اکسیدانتی سلولهای بدن ضعیف گشته و بدن را در برابر حمله رادیکالهای آزاد مستعد می کند. حمله رادیکالهای آزاد به بافت بیضه باعث کاهش تعداد و تمایز رده های سلولهای جنسی و تخریب ساختار بافت بیضه می شود. ایجاد هر گونه ناهنجاری در بافت بیضه منجر به ایجاد اختلال در عملکرد سیستم تناسلی و کاهش توانایی باروری می شود و در صورت باروری می تواند نسلهای بعد را هم تحت الشعاع قرار دهد. لذا هنگام استفاده از این داروها باید عوارض جانبی آنها را مد نظر قرار داد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله بدینوسیله از دانشکده علوم پایه، دانشکده علوم پزشکی و دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه جهت همکاری صمیمانه در انجام این مطالعه تشکر و قدردانی می نمایند. این مطالعه مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی می باشد و هزینه های آن از محل بودجه پایان نامه های کارشناسی ارشد بخش زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه تامین گردید.

References

[1] Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA, Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproducetion. ***Fertil Steril*** 79 (2003) 829-43.

[2] Aitken RJ, The Amoroso lecture. The human spermatozoa-a cell in crisis. ***J Reprod Fertil*** 115 (1999) 1-7.

[3] Anderson D, Bishop JB, Garner RC, Ostrosky-Wegman P, Selby PB, Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. ***Mutat Res*** 330 (1995) 115–1١8.

[4] Arumugam N, Sivakumar V, Thanislass J, Devaraj H, Effects of acrolein on rat liver antioxidant defense system. ***Indian J Exp Biol*** 35 (1997) 1373-74.

[5] Ballester J, Dominguez J, Munoz MC, Sensat M, Rigau T et al, Tungstate treatment improves Leydig cell function in streptozotocin-diabetic rats. ***J Androl*** 26 (2005) 706-15.

[6] Brock N, Oxazaphosphorine cytostatics: past-present-future. Seventh Cain Memorial Award lecture. ***Cancer Res*** 49 (1989) 1-7.

[7] Cai L, Hales BF, Robaire B, Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. ***Biol Reprod*** 56 (1997) 1490-7.

[8] Courtade M, Clinical characteristic and transmission electron microscopic sperm defectof infertile men. ***Fert Steril*** 70 (1998) 297-304.

[9] Das UB, Mallick M, Debnath JM, and Ghosh D, Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide-induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. ***Asian J Androl*** 4 (2002) 201–207.

[10] Debnath D, and Mandal TK, Study of quinalphos (an environmental oestrogenic insecticide) formulation (Ekalux 25 E.C)-induced damage of the testicular tissues and antioxidant defense system in Sprague-Dawley albino rats. ***J Appl Toxicol*** 20 (2000) 197–204.

[11] de Jager C, Bornman MS, van der Horst G, The effect of pnonylphenol, an environmental toxicant with oestrogenic properties, on fertility potential in adult male rats. ***Andrologia*** 31 (1999) 99-106.

[12] de Jong WK, Groen HJ, Koolen MG, Biesma B, Willems LN, Kwa HB , van Bochove A, van Tinteren H, Smit EF, Phase III study of cyclophosphamide, doxorubicin, and etoposide compared with carboplatin and paclitaxel in patients with extensive disease small-cell lung cancer. ***Eur J Cancer*** 43 (2007) 2345–2350.

[13] Duggan DB, Petroni GR, Johnson JL, Glick J, Fisher RI, Connors JM, Canellos GP, Peterson BA, Randomized comparison of ABVD and MOPP/ABV hybrid for the treatment of advanced Hodgkin's disease: report of an intergroup trial. ***J Clin Oncol*** 15 (2003) 21(4) 607-14.

[14] Elangovan N, Chiou TJ, Tzeng WF, Chu ST, Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice.***Toxicology*** 222 (2006) 60-70.

[15] Esterbaur H, Cheeseman KH, Determination of aidehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4- hydroxynoneal. *Methods Enzymol* 186 (1990) 407-21.

[16] Fraiser LH, Kanekal S, and Kehrer JP, Cyclophosphamide toxicity. Characterising and avoiding the problem. ***Drugs*** 42 (1991)781-95.

[17] Gagnon C, de Lamirande E, ***Male sterility and motility disorders***, 1st ed. New York: Springer- Verlag, 1999, p. 37-44.

[18] Ghosh D, Das UB, Ghosh S, Mallick M, and Debnath J, Testicular gametogenic and steroidogenic activities in cyclophosphamide treated rat: A correlative study with testicular oxidative stress. ***Drug Chem Toxicol*** 25 (2002) 281 – 92.

[19] [Haque R, Bin-Hafeez, Ahmad I, Parvez S, Pandey S, Raisuddin S, Protective effects of Emblica officinalis Gaertn. In cyclophosphamide-treated mice. *Hum Exp Biol* 20 (2001) 643–50.

[20] Hengstler JG, Fuchs J, Tanner B,Oesch-Bartlomowicz B, Hölz C, and Oesch F, Analysis of DNA single-strand breaks in human venous blood: a technique which does not require isolation of white blood cells. ***Environ Mol Mutagen*** 29 (1997) 58-62.

[21] Howell SJ, Radford JA, Ryder WDJ, and Shalet SM, Testicular function after cytotoxic chemotherapy: Evidence of leydig cell insufficiency. ***J Clin Oncol*** 17 (1999) 1493-1498.

[22] Howell S, and Shalet S, Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. ***Endocrinol Metab Clin North Am*** 27 (1998) 927-943.

[23] Howell SJ, Shalet SM, Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. ***J Natl Cancer Inst Monogr*** 34 (2005) 7-12.

[24] Katoh C, Kitajima S, Saga Y, Kanno J, Horii I, Inoue T,

Assessment of quantitative dual-parameter flow cytometric analysis for the evaluation of testicular toxicityusing cyclophosphamide- and ethinylestradioltreated rats. ***J Toxicol Sci*** 27 (2002)87–96.

[25] Lindi L, Haolin C, Michael A, Trush MD, Show M, Anway D, Barry Zirkin R, Aging and the Brown Norway Rat Leydig Cell Antioxidant Defense System. ***J Androl*** 22 (2005) 32-37.

[26] [Ludeman SM , the chemistry of the metabolites of cyclophosphamide. ***Curr Pharm Des*** 5 (1999) 627- 643.

[27] McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton tification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. ***Recent Prog Horm Res*** 57 (2002) 149-79.

[28] Mythili Y, Sudharsan PT, Selvakumar E, and Varalakshmi P, Protective effect of dl- α-lipoic acid on cyclophosphamide induced oxidative cardiac injury. ***Chem Biol Interact*** 30 (2004) 13-19.

[29] Mruk DD, Cheng CY, Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. ***Endocr Rev*** 25 (2004)747-806.

[30] Newton SC, Blaschuk OW, Millette CF, Ncadherin mediates Sertoli cell-spermatogenic cell adhesion. ***Dev Dyn*** 197 (1993)1-13.

[31] [Qiu J, Hales BF and Robaire B, Damage to rat spermatozoal DNA after chronic cyclophosphamide exposure. ***Biol Reprod*** 53 (1995a) 1465-73.

[32] Rezvanfar MA, Farshid AA, Sadrkhanlou RA, Ahmadi A , Rezvanfar MA, Salehnia A, Abdollahi M, Benefit of Satureja khuzestanica in subchronicallyratmodelof cyclophosphamide-inducedhemorrhagiccystitis. ***Exp Toxicol Pathol*** 62 (2010) 323–30.

[33] Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, Klinefelter GR, Makris SL, Perreault SD, Schrader S, Seyler D, Sprando R, Treinen KA,Veeramachaneni DN, and Wise LD, Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation. ***Reprod Toxicol*** 10 (1996) 237-44.

[34] Selvakumar E, Prahalathan C, Sudharsan PT, and Varalakshmi P, Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. ***Toxicology*** 217 (2006) 71-78.

[35] Sikka SC, Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. ***Curr Med Chem*** 8 (2000) 851-862.

[36] Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL, The labratoty rat. 2th edn, Elsevier (2006) 831-833.

[37] Tan KA, Walker M, Morris K, Greig I, Mason JI, Sharpe RM, Infant feeding with soy formola milk: effect of puberty progression, reprodactive function and testicular cell numbers in marmoset monkeys in adulthood. ***Hum Reprod*** 21 (2006) 896-904.

[38] Vogl AW, Pfeiffer DC, Mulholland D, Kimel G, and Guttman J, Unique and multifunctional adhesion junctions in the testis: ectoplasmic specializations. ***Arch Histol Cytol*** 63 (2000) 1-15.

[39] Verma A, Kanwar KC, Human sperm motility and lipid peroxidation in different ascorbic acid concentrations: an in vitro analysis. ***Andrologia*** 23 (1998) 325-29.

[40] Woo AL, James PF, Lingrel JB Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na, K-ATPase. ***J Biol Chem*** 275 (2000) 20693-99.

[41] World Health Organization (WHO). WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge, United Kingdom: *Cambridge University Press* 1999.

[42] Zhang H, Zhou QM, Li XD, Xie Y, Duan X, Min FL, Liu B, Yuan ZG, Ginsenoside R_e]42[increases fertile and asthenozoospermic infertile human sperm motility by induction of nitric oxide synthase. ***Arch Pharm Res*** 29 (2006) 145-51.

[43] Zhengwei Y, Mc Lachlan RI, Bremner WJ, Wreford NG, Quantitive (stereological) study of the normal spermatogenesis in the adult monkey (Macaca fascicularis). ***J Androl*** 18 (1997) 681-7.

[44] Zorn B, Vidmar G, Meden-Vrtovec H, Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmicsperm injection. ***Int J Androl***. 26 (2003) 279-85.