

اثر محافظتی ملاتونین بر تغییرات هیستولوژیک بیضه موش بالغ تحت درمان با بوسولفان

فهیمة محمد قاسمی^{۱*}، معصومه فغانی^۱، سینا خواجه جهرمی^۲

۱- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی گیلان، رشت، ایران

۲- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی گیلان، رشت، ایران

چکیده

زمینه و هدف: اثرات سیتوتوکسیک شیمی درمانی و اثرات آن در قدرت باروری، از نظر بالینی حائز اهمیت است. ملاتونین، هورمون غده اپی فیز به عنوان آنتی اکسیدان شناخته شده است. هدف از تحقیق حاضر بررسی اثرات محافظتی ملاتونین روی اختلالات اسپرماتوژنز ناشی از درمان با بوسولفان با کمک ارزیابی های بافت شناسی بافت بیضه می باشد.

روش بررسی: مطالعه حاضر روی ۳۲ موش نر بالغ ۸ هفته انجام شد. حیوانات در چهار گروه شامل گروه کنترل دریافت کننده DMSO گروه ۲، دریافت کننده تک دوز 20 mg/kg بوسولفان به صورت داخل صفاقی و گروه ۳ با 10 mg/kg ملاتونین برای ۵ روز به صورت داخل صفاقی درمان شدند. گروه ۴ به دنبال تجویز 20 mg/kg بوسولفان، به مدت ۵ روز ملاتونین دریافت می کرد. ۳۵ روز پس از شروع درمان، بیضه همه حیوانات از بدن خارج شد و ارزیابیها از طریق مشخص نمودن نمره بندی جانسون، مطالعات مورفومتری لوله های سمی نیفروس، تخمین حجم سلول های لیدیک و شمارش سلول های زایا انجام شد. آنالیزهای آماری با کمک روش ANOVA انجام گرفت و سطح آماری $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج: موش های تحت درمان با بوسولفان در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنی دار در ارزیابیها براساس معیار نمره بندی جانسون و کیفیت اسپرماتوژنز نشان دادند ($p < 0.001$). پارامترهای کمی لوله های سمی نیفروس ($p < 0.05$) و حجم هسته سلول های لیدیک به طور معنی دار در گروه دوم در مقایسه با کنترل کاهش داشت. در حالیکه ملاتونین در گروه ۴، باعث طبیعی شدن قابل توجه پارامترهای لوله های سمی نیفروس ($p < 0.05$)، حجم هسته سلول های لیدیک ($p < 0.001$) و نتایج ارزیابی براساس معیار جانسون ($p < 0.001$) در مقایسه با گروه ۲ شد. ملاتونین تعداد همه سلول های زایا را در گروه ۴ در مقایسه با گروه ۲ به صورت معنی دار ($p < 0.05$) افزایش داد.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که ملاتونین دارای اثر محافظتی روی آسیب های بیضه القاء شده با بوسولفان است، هرچند که مکانیسم نامشخص است. احتمالاً این عمل از طریق کاهش آسیب های اکسیداتیو صورت می گیرد.

* مسئول مکاتبه: فهیمة محمد

قاسمی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، مجتمع دانشگاهی گیلان، کیلومتر ۱۰ جاده تهران، رشت، صندوق پستی ۲۴۷۷

رایانامه:

Parsahistolab@gmail.com

دریافت: ۱۳۸۸/۴/۶

پذیرش: ۱۳۸۸/۸/۱۹

کلید واژگان: اسپرماتوژنز، بوسولفان، بیضه، سلول لیدیک، شیمی درمانی، ملاتونین، ناباروری مردان.
نحوه استناد به این مقاله: محمد قاسمی فهیمة، فغانی معصومه، خواجه جهرمی سینا. اثر محافظتی ملاتونین بر تغییرات هیستولوژیک بیضه موش بالغ تحت درمان با بوسولفان. فصلنامه باروری و ناباروری: سال ۱۱ (۱۳۸۹)، شماره ۲، صفحات: ۶۷-۷۶.

زمینه و هدف

شیمی درمانی و اشعه درمانی با تغییرات زیادی در دستگاه خاصیت آلیله کنندگی بیشترین اثرات سوء را روی بیضه ایجاد می کنند (۱). امروزه به خصوص در کشورهای

شیمی درمانی و اشعه درمانی با تغییرات زیادی در دستگاه تناسلی مردان همراه است و در بین این عوامل، داروهای با

به میتوکندری‌های اسپرم به دنبال راکتیوهای اکسیژن را کاهش می‌دهد (۱۴). تجویز یک دوز بالا، 100 mg/kg ملاتونین در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در معرض اشعه x ، مانع ایجاد آسیب‌های حاد در بیضه آنها می‌شود (۱۴). علاوه بر این مطالعات تجویز ملاتونین در موش‌های دیابتیک تحت درمان با استروپتوزوتوسین^۱ (۱۵) و نیز موش‌های تحت درمان با سیس پلاتین^۲ باعث کاهش عوارض جانبی داروهای نامبرده روی بیضه می‌شود. Reiter معتقد است که ملاتونین می‌تواند سمیت و عوارض جانبی داروها را کاهش دهد (۱۶). در ارتباط با استفاده توام ملاتونین و بوسولفان و اثر آن روی تغییرات بیضه گزارشی در دسترس نیست. لذا هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی اثرات محافظتی احتمالی ملاتونین، روی تغییرات هیستولوژیک اسپرماتوزن در موش‌های بالغ تحت شیمی‌درمانی با داروی بوسولفان می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه از ۳۲ موش بالغ نر ۸-۶ هفته، نژاد NMRI استفاده گردید. حیوانات از موسسه رازی خریداری و به منظور تطابق با محیط ۲ هفته در قفس‌های خود با دسترسی آزادانه به آب و غذا و شرایط محیطی استاندارد نگهداری شدند. پس از آن حیوانات به ۴ گروه (هر گروه شامل ۸ حیوان) تقسیم شدند.

۱- **گروه کنترل:** به میزان 0.05 ml دی‌متیل‌سولفواکساید (Sigma, USA) ۲ درصد (حلال بوسولفان) مطابق udagawa (۳) به صورت تک دوز داخل صفاقی دریافت نمودند.

۲- **گروه تحت درمان با بوسولفان:** به میزان 20 mg/kg بوسولفان (Sigma, USA)، به صورت داخل صفاقی و تک دوز دریافت نمودند.

۳- **گروه تحت درمان با ملاتونین:** که به مدت ۵ روز روزانه 10 mg/kg ملاتونین (Sigma, USA) به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. جهت حالیت ملاتونین مطابق Ateşşahin (۱۵) از اتانول ۱٪ استفاده می‌شد.

پیشرفته، درمان موفق بدخیمها و امید به زندگی در این افراد به میزان بالایی افزایش یافته است و عمده این افراد، به ویژه افراد جوان، پس از بهبودی تمایل به داشتن قدرت باروری و فرزند هستند (۲). از جمله عوامل شیمی‌درمانی آلکیله کننده می‌توان بوسولفان را نام برد که به منظور درمان لوسمی مزمن، سرطان تخمدان و همچنین قبل از پیوند مغز استخوان در بیماران سرطانی استفاده می‌شود (۳). بیشتر مطالعات در مورد اثرات توکسیک بوسولفان بر بیضه به طور عمده روی مدل‌های جوندگان مانند موش و رت بوده و به خصوص در سال‌های اخیر به منظور القاء آزواسپرمی قبل از پیوند سلول‌های ژرمینال به بیضه در گونه‌های مختلف استفاده شده است (۴،۵). مصرف این دارو پس از یک یا دو تزریق داخل صفاقی، بخش عمده‌ای از اسپرماتوگونیها را از بین می‌برد (۴،۵). ضمن اینکه بهبودی باروری در موش‌های تحت درمان با بوسولفان در طول زمان به‌طور خود بخود صورت نمی‌گیرد؛ زیرا، بافت بیضه و لوله‌های سمی‌نیفروس و سلول‌های زایا به شدت آسیب می‌بینند (۶،۷).

ملاتونین که یکی از ترشحات غده اپی فیز است در تنظیم برخی پدیده‌های فیزیولوژی مؤثر می‌باشد. ملاتونین دارای عملکرد نورونی-هورمونی، تنظیم کننده تولید مثل، ایمنی و دما است. علاوه بر این موارد ملاتونین روی تکثیر و تزايد و تمایز سلولی اثر دارد (۸). همچنین اثرات ضد سرطانی و ضد پیری آن نیز گزارش شده است (۹). ملاتونین امکان برداشت و خنثی نمودن رادیکال‌های آزاد شامل رادیکال‌های هیدروکسیل، پراکسیل و آنیون‌های پراکسی نیترات را دارا می‌باشد (۱۰). مصرف ملاتونین در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی، سلولها را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌نماید و در واقع استرس‌های اکسیدان را به طرق متعددی کاهش می‌دهد (۱۱). ضمن این که نشان داده شده که ملاتونین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی ضعیفی روی اسپرم انسان است (۱۲). گیرنده‌های ملاتونین روی بافت‌های مختلف از جمله پروستات، سلول‌های پوشش اپیدیدیم و به میزان کمی روی اسپرم بیان می‌شوند (۱۳).

همچنین تجویز ملاتونین در انسان آسیب‌های وارده

1- Streptozotocin

2- Cisplatin

۴- گروه تحت درمان ترکیبی: ابتدا یک تک دوز 20 mg/kg ، بوسولفان دریافت می‌کردند و پس از آن به مدت ۵ روز، روزانه 10 mg/kg ملاتونین دریافت نمودند. ۳۵ روز پس از شروع درمان، همه حیوانات به طریقه جابجایی نخاع، کشته و بیضه آنها از حفره شکم خارج شد. به منظور ثبوت بافتی، بیضه‌ها به داخل محلول فیکساتیو فرمالدئید بافری ۱۰ درصد به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق غوطه‌ور می‌شدند.

ارزیابی لوله‌های سمی نیفروس

پس از گذشت سه روز از ثابت نمودن و اطمینان از ثبوت بافتی بیضه‌ها، نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری پاساژ بافتی شدند. به منظور مطالعه با پاساژ از اتانول با درجات صعودی، گزین و پارافین مذاب استفاده شد. برای به حداکثر رساندن تعداد برش‌های مناسب لوله‌های سمی نیفروس در مقطع عرضی، بیضه‌ها در جهت محور طولی در پارافین قالب‌گیری شدند. سپس با استفاده از دستگاه میکروتوم دوار (Leitz, Germany) مقاطعی به ضخامت 5μ تهیه شد. از هر بیضه ۴ تا ۵ اسلاید تهیه و به طریقه هماتوکسیلین و اتوزین رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) و با درشت‌نمایی $400\times$ مورد مطالعه قرار می‌گرفتند. به منظور مطالعه بلوغ و کیفیت لوله‌های سمی نیفروس از روش جانسون استفاده می‌شد (۱۷). جدول جانسون بلوغ و به عبارتی دیگر کیفیت لوله‌ها را نشان می‌دهد. این جدول دارای نمره‌بندی ۱-۱۰ است. براساس معیارهای زیر به هر مقطع عرضی لوله سمی نیفروس داده می‌شود:

۱۰: اسپرماتوژنز کامل، تعداد زیادی سراسپرم که در حاشیه لومن گرد و منظم قرار دارند.

۹: تعداد زیادی اسپرم وجود دارد ولی لومن گرد و منظم دیده نمی‌شود.

۸: تعداد اسپرم خیلی کم است.

۷: اسپرم دیده نمی‌شود ولی تعداد زیادی اسپرماتید گرد دیده می‌شود.

۶: تعداد کمی اسپرماتید گرد دیده می‌شود.

۵: هیچ اسپرم و اسپرماتید گردی دیده نمی‌شود. تعداد زیادی اسپرماتوسیت اولیه دیده می‌شود.

۴: تعداد خیلی کمی اسپرماتوسیت اولیه دیده می‌شود.

۳: هیچ اسپرماتوسیت اولیه دیده نمی‌شود. فقط اسپرماتوگونی دیده می‌شود.

۲: هیچ سلول زایا وجود ندارد. فقط سلول سرتولی دیده می‌شود.

۱: نه سلول زایا و نه سلول سرتولی دیده می‌شود و لوله‌ها آتروفیک هستند.

ارزیابی کمی پارامترهای لوله سمی نیفروس

جهت ارزیابی کمی پارامترهای لوله سمی نیفروس، از گریدهای مدرج خطی بر لنز چشمی میکروسکوپ استفاده شد. در هر حیوان به طور تصادفی ۲۰ لوله سمی نیفروس در مقطع عرضی گرد و یا تقریباً گرد انتخاب و مطالعه شد. لوله‌هایی که بیضوی بودند یا برش مایل داشتند مطالعه نشدند. با بزرگنمایی $400\times$ اقطار لوله‌های سمی نیفروس یعنی از غشاء پایه یکطرف لوله تا غشاء پایه طرف دیگر براساس میکرومتر محاسبه گردید. ابتدا دو قطر عمود بر هم محاسبه و سپس میانگین اقطار در هر لوله محاسبه شد. همچنین به طریق مشابه، میانگین قطر مجرای داخل لوله سمی نیفروس و ضخامت اپیتلیوم ژرمینال براساس میکرومتر محاسبه شد (۱۴).

محاسبه حجم سلولهای لیدیک

با کمک گرید خطی و با بزرگنمایی $1000\times$ ، حجم هسته سلول‌های لیدیک محاسبه شد. بدین ترتیب که در هر حیوان ۲۰ سلول مطالعه گردید. ابتدا از فرمول $R = \sqrt{D2 \times D1/2}$ شعاع به دست آمد. که در این فرمول R معادل شعاع و D1 و D2 به ترتیب اقطار کوچک و بزرگ سلول است. همچنین برای مطالعه حجم از فرمول $V = 4/3 \pi R^3$ استفاده شد. $\pi = 3.14$ عدد ثابت بود (۱۸).

شمارش سلولهای زایا

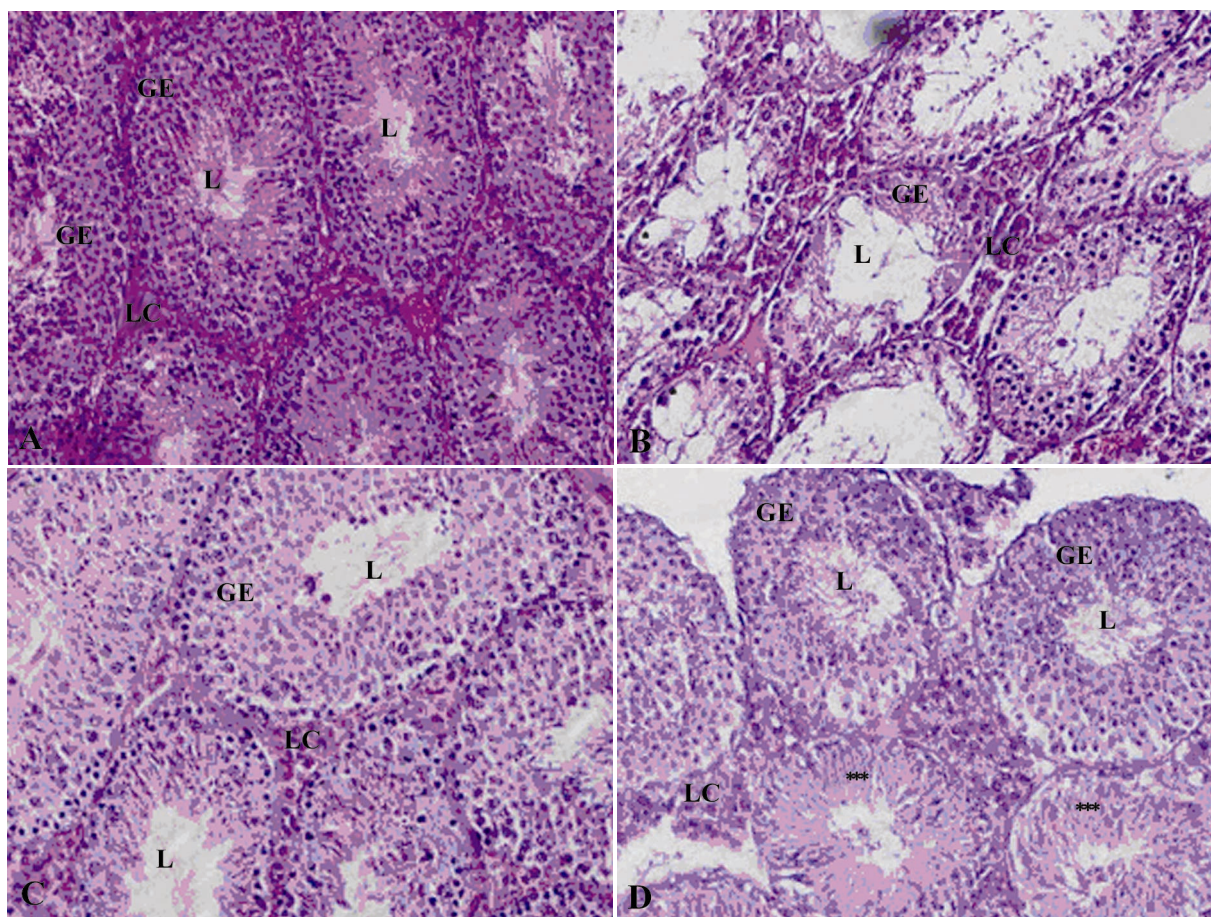
براساس ریخت‌شناسی هر سلول، سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید گرد و اسپرماتوزوا در مقطع عرضی ۲۰ لوله سمی نیفروس در هر حیوان شمارش شد. فقط لوله‌های گرد مورد شمارش قرار گرفتند و لوله‌هایی که مایل و یا بیضوی بودند و یا حاوی

نتایج

در مطالعه بافت‌شناسی، در گروه کنترل اسپرماتوزن فعال در لوله‌های سمی‌نیفروس در مراحل مختلف همراه با اسپرم‌های اسپرم‌های بالغ یا در حال بلوغ مشاهده شد. در این لوله‌ها اپیتلیوم ژرمینال از ضخامت قابل توجهی برخوردار بود و انواع سلول‌های زایا شامل اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتوسیت ثانویه، اسپرماتیدهای جوان گرد و اسپرماتیدهای بالغ دراز یا اسپرماتوزوئید و همچنین سلول‌های سرتولی مشاهده شدند. در بافت بینابینی،

سلول‌های ریش یافته به داخل لومن بودند مورد شمارش سلولی قرار نگرفتند.

آنالیز آماری: نتایج ریخت‌شناسی میکروسکوپ نوری در نمونه‌های مورد مطالعه با هم مقایسه و بلوغ اسپرماتوزن و همچنین کلیه پارامترهای کمی محاسبه شده با استفاده از برنامه آماری SPSS و آزمون واریانس یک طرفه تحلیل شدند. یافته‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار بیان و مقادیر $p \leq 0.05$ معنی‌دار تلقی گشت. همچنین جهت ارزیابی تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها از تست توکی استفاده شد.



شکل ۱. A- فوتومیکروگراف نوری از لوله‌های سمی‌نیفروس موش کنترل. به اسپرماتوزن فعال در لوله‌ها توجه شود. B- لوله‌های سمی‌نیفروس در گروه تحت درمان با بوسولفان را نشان می‌دهد. به تخریب اسپرماتوزن و حضور واکوئل (*) در ضخامت اپیتلیوم ژرمینال و از بین رفتن سلول‌های زایا و کاهش اقطار لوله‌های سمی‌نیفروس توجه نمایید. C- اسپرماتوزن در موش تحت درمان با ملاتونین را نشان می‌دهد اسپرماتوزن مانند کنترل فعال است. D- لوله‌های سمی‌نیفروس در گروه تحت درمان با بوسولفان + ملاتونین را نشان می‌دهد. ملاتونین باعث حفظ اسپرماتوزن در موش تحت شیمی‌درمانی شده است. اغلب لوله‌ها اسپرماتوزن فعال را نشان می‌دهند. هرچند که در برخی لوله‌ها (***) هنوز اسپرماتوزن فعال نشده است لومن (L)، اپیتلیوم ژرمینال (GE)، سلول لیدیگ (LC)، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین، ائوزین. بزرگنمایی ۱۶۰ برابر.

جدول ۱. اثر بوسولفان و ملاتونین بر نمره بندی جانسون و تعداد سلولهای زایای لوله سمی نیفروس موش بالغ (M±SD)

گروه	نمره بندی جانسون	تعداد اسپر ماتوگونی	تعداد اسپر ماتوسیت اولیه	تعداد اسپر ماتوسیت گرد	تعداد اسپر ماتوزوآ
کنترل	۹/۵۱±۰/۴۲	۳/۸۳±۰/۸۰	۶۳/۹۰±۸/۳	۱۴۰/۵۵±۳۰/۲۶	۱۳۹/۸±۴۰/۷۷
بوسولفان	۳/۱۰±۰/۶۴ ^{ab}	۱/۳۶±۰/۰۵ ^{ab}	۱۷/۸±۳/۵۰ ^{ab}	۶۰/۸۹±۱۱/۷۴ ^{ab}	۲۸/۳۲±۹/۲۶ ^{ab}
ملاتونین	۹/۵۸±۱/۶ ^b	۳/۵۰±۰/۶۱ ^b	۶۰/۳۷±۶/۴۰ ^b	۱۳۵/۲۰±۲۱/۵۰ ^b	۱۳۱/۴۲±۳۶/۲۰ ^b
ملاتونین + بوسولفان	۷/۴±۱/۲۷ ^a	۳/۳۰±۰/۴ ^a	۴۸/۲۲±۶/۴۰ ^a	۱۲۰/۴۴±۲۰/۷۰ ^a	۱۰۰/۳۴±۳۴/۰ ^a

a: در مقایسه با گروه کنترل $P < 0.001$; b: در مقایسه با گروه ملاتونین + بوسولفان $P < 0.001$

بافت همبندی سست همراه با عروق خونی، اعصاب، سلولهای بافت همبندی و همچنین سلولهای اسیدوفیل لیدیک به صورت تکی و یا تجمعات سلولی با هسته گرد قابل مشاهده بودند (شکل A-۱).

در گروه تحت درمان با 20 mg/kg بوسولفان، تخریب اسپر ماتوزن به وضوح قابل مشاهده است. در اغلب لوله‌ها تعداد زیادی از سلولهای زایا از بین رفته بودند و ضخامت اپی تلیوم ژرمینال به طور معنی داری کاهش داشت. در ضخامت اپیتلیوم ژرمینال واکوئله‌ها مشهود بودند. تعداد زیادی از لوله‌ها فاقد اسپر ماتید گرد و اسپر ماتید دراز بودند. عمده لوله‌ها دارای اسپر ماتوگونی و تعدادی کم اسپر ماتوسیت اولیه بودند. هرچند که بندرت هنوز برخی لوله‌ها دارای اسپر ماتید نیز بودند. کلیه عناصر تشریحی موجود در بافت بینابینی همراه با سلولهای لیدیک در فاصله بین لوله‌های سمی نیفروس دیده شد (شکل B-۱).

در گروهی که میزان 10 mg/kg ملاتونین مصرف کرده بود تغییرات ریخت‌شناسی خاصی در مقایسه با کنترل دیده نشد (شکل C-۱). در گروه تحت درمان ترکیبی، لوله‌ها دارای انواع متنوع سلولهای زایا بودند و ضخامت اپیتلیوم ژرمینال به صورت قابل توجه بیشتر از گروه دوم و در ضخامت آن، واکوئل خیلی کمتر دیده می‌شد. در اغلب لوله‌ها اسپر ماتوزن فعال دیده می‌شد هرچند که هنوز برخی از آنها فعال نشده بودند (شکل D-۱).

میانگین نمره بندی جانسون، درصد لوله‌های بالغ سمی نیفروس و همچنین تعداد سلولهای زایا در گروه‌های

مورد مطالعه در جدول ۱ بیان شده است. در گروه کنترل میانگین نمره بندی جانسون در آنها 9.51 ± 0.42 بود. در حالیکه در گروه تحت درمان با بوسولفان نمره بندی جانسون 3.10 ± 0.64 بود که به صورت معنی دار ($P < 0.001$) کاهش داشت (جدول ۱). همانطور که در جدول مشخص است تعداد کلیه سلولهای زایا نیز در گروه تحت بوسولفان به صورت معنی دار ($P < 0.001$) در مقایسه با کنترل کاهش دارند. در گروهی که فقط ملاتونین مصرف نموده بود، میانگین جانسون 9.58 ± 1.6 بود که در مقایسه با کنترل تغییری نشان نداد. ضمن این که تعداد کلیه سلولهای زایا نیز در مقایسه با کنترل تفاوتی نشان نداد. در حالیکه مصرف بوسولفان توام با ملاتونین، میانگین جانسون را به 7.4 ± 1.27 افزایش داد که در مقایسه با گروه تحت درمان با بوسولفان معنی دار ($P < 0.001$) بود. علاوه بر آن، تعداد کلیه سلولهای زایا در مقایسه با گروه تحت درمان با بوسولفان افزایش یافت. به عبارتی دیگر مصرف ملاتونین باعث افزایش بلوغ و کمیت سلولهای لوله سمی نیفروس در گروه تحت شیمی درمانی شد.

میانگین تغییرات کمی اقطار لوله‌های سمی نیفروس و سلولهای لیدیک در گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۲ بیان شده است. مصرف بوسولفان نه تنها ضخامت اپی تلیوم ژرمینال را $28.50 \pm 3.85 \mu\text{m}$ در مقایسه با کنترل $65.00 \pm 4.2 \mu\text{m}$ کاهش داد بلکه باعث کاهش معنی دار ($P < 0.05$) در قطر لوله‌های سمی نیفروس نیز شد (جدول ۲). در گروهی که فقط ملاتونین دریافت کرده بود هرچند که از نظر

جدول ۲. اثر بوسولفان و ملاتونین بر لوله سمی نیفروس و سلول لیدیک موش بالغ (M±SD)

گروه	قطر لوله (μm)	قطر لومن (μm)	ضخامت اپیتلیوم (μm)	قطر هسته سلول لیدیک (μm)	حجم هسته سلول لیدیک (μm^3)
کنترل	۱۵۶/۲۵±۷/۷۲	۷۹/۰۰±۵/۴	۶۵/۰۰±۴/۲	۶/۸۲±۰/۵۱	۱۱۱/۹۱±۲/۱
بوسولفان	۹۵/۳۷±۳/۴۶ ^{ab}	۶۷/۰۰±۶/۷۸ ^{ab}	۲۸/۵۰±۳/۸۵ ^{ab}	۵/۲±۰/۶۴ ^{ab}	۸۵/۳۷±۵/۹۵ ^{ab}
ملاتونین	۱۵۵/۱۲±۸/۶۵ ^b	۸۶/۸۷±۵/۵۱ ^{ab}	۶۱/۰۰±۶/۶۳ ^{ab}	۶/۷±۰/۵۵ ^a	۱۱۰/۰۲±۴/۳۷ ^b
ملاتونین+بوسولفان	۱۲۹/۱۲±۹/۳۲ ^a	۷۸/۳۷±۶/۱۳	۵۱/۱۳±۵/۵۱ ^a	۶/۷۱±۰/۳۹	۱۰۳/۰۰±۳/۸۱ ^a

a: در مقایسه با گروه کنترل $P < 0.05$; b: در مقایسه با گروه ملاتونین + بوسولفان $P < 0.05$

ریخت‌شناسی تفاوت خاصی با کنترل دیده نشد؛ ولی ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال به صورت معنی‌دار $61/00 \pm 6/63 \mu m$ در مقایسه با کنترل $65/00 \pm 4/2 \mu m$ کاهش نشان داد؛ که شاید ناشی از اثرات ملاتونین بر روی محور هیپوتالاموسی هیپوفیزی-گنادی باشد.

مصرف تک دوز $20 mg/kg$ بوسولفان کاهش معنی‌داری در عمده پارامترهای لوله سمی نیفروس شامل: قطر لوله‌ها و ضخامت اپیتلیوم ژرمینال ایجاد نمود هرچند که به دلیل کاهش پارامترهای نامبرده، ضخامت مجرای داخلی لوله‌ها افزایش معنی‌دار نشان می‌داد. حجم هسته سلول‌های لیدیک در گروه تحت درمان با بوسولفان $85/37 \pm 5/95 \mu m^3$ بود که در مقایسه با کنترل $111/91 \pm 2/1 \mu m^3$ کاهش معنی‌دار داشت ($P < 0.05$) (جدول ۲). مصرف ملاتونین در گروه تحت درمان ترکیبی نه تنها باعث افزایش ضخامت اپیتلیوم ژرمینال و اقطار لوله‌ها شد؛ بلکه حجم هسته سلول‌های لیدیک را $103/00 \pm 3/81 \mu m^3$ به صورت معنی‌دار ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه تحت درمان با بوسولفان $85/37 \pm 5/95 \mu m^3$ افزایش داد.

به عبارتی دیگر تجویز ملاتونین به میزان $10 mg/kg$ به مدت ۵ روز در گروه تحت شیمی‌درمانی با $20 mg/kg$ بوسولفان، منجر به کاهش عوارض ناشی از مصرف بوسولفان بر روی بیضه شد.

بحث

مطالعه حاضر اثرات بوسولفان و ملاتونین را روی

تغییرات کمی، کیفی و بلوغ اسپرماتوژنز بررسی می‌نماید که مارکرهای مهمی برای کیفیت اسپرماتوژنز هستند و این پارامترها می‌توانند اطلاعات مفیدی در ارتباط با پتانسیل باروری حیوانات ارائه دهند.

در این مطالعه تجویز تک دوز $20 mg/kg$ بوسولفان، باعث کاهش بلوغ اسپرماتوژنز و عمده پارامترهای کمی بیضه شد. مصرف بوسولفان باعث از بین رفتن کلیه سلول‌های زایای بیضه شد که این اثر ناشی از خاصیت آلکیل‌کنندگی بوسولفان است که دارای اثرات مخرب روی سلول‌های در حال تکثیر می‌باشد (۱۹). هرچند که عده‌ایی دیگر نیز بر این عقیده‌اند که مصرف بوسولفان می‌تواند باعث توقف تقسیم سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و یا مرگ آنها گردد (۲۰). این مطلب خود می‌تواند با کاهش بلوغ اسپرماتوژنز همراه باشد. هرچند که تعداد زیادی از سلول‌های زایا از بین رفته بودند؛ ولی در داخل لوله‌ها و بر روی غشاء پایه هنوز اسپرماتوگونیا دیده شدند. احتمالاً باقی ماندن اسپرماتوگونیا می‌تواند دلیلی بر این باشد که این سلولها بتوانند پس از مدتی با تقسیم خود سلول‌های زایایی را در لوله سمی نیفروس ایجاد بنمایند. نشان داده شده که در موشها به دنبال تجویز بوسولفان، سلول‌های اسپرماتوگونی باقیمانده می‌توانند مجموعه‌ایی از سلولها را تشکیل دهند؛ هرچند که این سلولها نمی‌توانند متمایز شوند (۲۱). در مطالعه حاضر در ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال واکوئل‌هایی دیده می‌شود که این واکوئلها می‌توانند در نتیجه از بین رفتن سلول‌های زایا باشند. در واقع این واکوئلها می‌توانند

آندروژن تولیدی توسط سلول‌های لیدیگ کاهش یافته است؛ هرچند که محققان مطالعه حاضر مطالعه‌ای در این زمینه انجام ندادند. ضمن این که در مطالعه Chatterjee روی بیماران مبتلا به لنفوم و تحت شیمی‌درمانی سطح تستوسترون سرم به طور معنی‌داری کاهش یافته بود (۳۰).

در مطالعه حاضر اثر تجویز ملاتونین به تنهایی و به صورت توأم با بوسولفان روی اسپرماتوژنز نیز مورد بررسی قرار گرفت. ملاتونین به عنوان مهم‌ترین ترشح غده اپی فیز آنتی‌اکسیدانتی بسیار مؤثر و خنثی کننده رادیکال‌های آزاد است (۸). ملاتونین به دلیل داشتن اندازه کوچک و خاصیت چربی دوستی زیاد به راحتی از غشاء سلول عبور می‌کند و در کل سلول پخش می‌شود. غلظت آن در هسته سلول بسیار بالا است و DNA را در برابر عوامل مخرب حفظ می‌نماید (۸). مطالعه حاضر نشان داد که مصرف 10 mg/kg ملاتونین برای مدت ۵ روز، به صورت توأم با بوسولفان، اثرات سوء بوسولفان را روی اسپرماتوژنز کاهش می‌دهد. بنابراین به نظر می‌رسد که بهبودی روند اسپرماتوژنز در گروه آخر تحت درمان ترکیبی، ناشی از خاصیت آنتی‌اکسیدانتی ملاتونین باشد. به طور مشابه با مطالعه حاضر، مصرف ملاتونین در رت‌های تحت درمان با سیس پلاتین (۱۵) و همچنین رت‌های دیابتیک تحت درمان با استرپتوزوتوسین آسیب وارده به بیضه را کاهش می‌دهد (۱۴). بنابراین به نظر می‌رسد که ملاتونین در مطالعه حاضر نیز سمیت و عوارض جانبی بوسولفان را کاهش داده است (۱۶). دوز مصرفی ملاتونین در مطالعه حاضر مشابه مطالعه Guneli و Atessahin بود (۱۴، ۱۵).

در مطالعه حاضر از بوسولفان استفاده شد؛ چرا که این دارو می‌تواند سلول‌های زایا را در مراحل اولیه تقسیم (اسپرماتوگونی) به میزان شدیدتری در مقایسه با سایر داروهای گنادوتوکسیک دیگر تخریب نماید (۳). بنابراین، باید که بهبودی اسپرماتوژنز به دنبال بوسولفان مشکل‌تر از دیگر داروهای گنادوتوکسیک و یا ضد سرطان باشد (۳). مصرف تک دوز بوسولفان در دوز 40 mg تا 50 mg به اِزاء کیلوگرم در موشها، با آزواسپرمی همراه است (۴، ۵). هرچند که دوز القاء کننده آزواسپرمی با کمک بوسولفان وابسته

نشان‌دهنده از دست دادن اتصالات سلولی و یا کاهش مولکول‌های چسبنده مانند کاده‌رینها^۱ باشند و می‌توانند به عنوان یکی از علائم پره‌آپوپتوز مطرح باشند (۲۲). ضمن این که براساس مطالعات قبلی تجویز تک دوز 40 mg/kg و همچنین 20 mg/kg بوسولفان در موشها می‌تواند تغییرات آپوپتوتیک را در سلول‌های زایای بیضه القاء نماید (۲۳، ۲۴).

علاوه بر این بوسولفان نه تنها تغییرات ریخت‌شناسی فراساختاری را در سلول‌های زایا بلکه در سلول‌های سوماتیک بیضه شامل سلول‌های لیدیگ، سرتولی و میوئید نیز القاء می‌کند که می‌تواند باعث تغییرات زیادی در بیضه و اسپرماتوژنز شوند. ضمن این که اسپرماتوژنز نتیجه اثرگذاری سلول‌های زایا و سوماتیک بر یکدیگر است (۲۵). به عبارت دیگر کاهش بلوغ اسپرماتوژنز، تعداد سلول‌های زایا و پارامترهای کمی لوله سمی‌نیفروس در گروه تحت شیمی‌درمانی می‌تواند ناشی از تغییرات توأم سلول‌های زایا و سوماتیک باشد. ضمن این که در مطالعه کنونی اقطار و حجم هسته و سلول لیدیگ نیز کاهش نشان داد. در تایید این یافته نشان داده شده که شیمی‌درمانی به‌طور غیرمستقیم روی کارکرد سلول‌های لیدیگ اثر دارد و باعث اختلال کارکردی این سلولها می‌شود (۲۶). ضمن این که در بررسی با میکروسکوپ الکترونی نیز اندازه و ارگانل‌های موجود در سلول‌های لیدیگ تحت درمان با 20 mg/kg بوسولفان، مانند شبکه آندوپلاسمی صاف، میتوکندری و همچنین قطرات چربی کاهش می‌یابد (۲۵). به طور کلی در بسیاری حیوانات شبکه آندوپلاسمی صاف و میتوکندری در سلول‌های استروئید ساز، مانند لیدیگ فراوانند. به دنبال هیپوفیزکتومی (۲۷) و کریپتورکیدیسم (۲۸) نیز حجم پارامترهای سلول لیدیگ کاهش می‌یابد. این نتایج پیشنهاد کننده این مطلب است که احتمالاً، فعالیت سنتزی سلول‌های لیدیگ در گروه تحت درمان با بوسولفان کاهش یافته است. ضمن این که ثابت شده است که بین حجم سلول‌های لیدیگ و مقدار شبکه آندوپلاسمی و ظرفیت ترش‌شی سلول لیدیگ ارتباط مستقیم وجود دارد؛ به عبارت دیگر، سلول‌های لیدیگ فعال‌تر دارای حجم بالاتری هستند (۲۹). پس احتمالاً در این مطالعه میزان

1- Cadherines

به گونه است و در حیوانات مختلف متفاوت است (۳۱). بنابراین مطالعه کنونی نشان داد که دوز 20 mg/kg بوسولفان در موش، با القاء ازواسپرمی همراه نمی‌باشد. هرچند که موجب تخریب شدید اسپرماتوژنز و اولیگواسپرمی می‌شود.

نتایج مطالعه کمی در گروه تحت درمان ترکیبی، با افزایش بلوغ اسپرماتوژنز در این گروه مطابقت دارد. احتمالاً این تغییرات و روند حفظ اسپرماتوژنز با بلوغ بهتر در گروه چهارم نسبت به گروه دوم می‌تواند ناشی از چند مکانیسم باشد:

الف- خاصیت آنتی اکسیدانی قوی ملاتونین، چرا که ملاتونین می‌تواند فعالیت و یا بروز ژن‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند: سوپر اکسید دیس موتاز، گلوکاتیون ردوکتاز و گلوکاتیون پر اکسیداز را تحریک نماید (۸).

ب- خواص آنتی آپوپتوتیک ملاتونین، که با مهار روند آپوپتوز سلول‌های زایا مانع تخریب اسپرماتوژنز شده است (۱۵). در تایید این مطلب، اثرات آنتی آپوپتوتیک ملاتونین بر روی بافت‌های مختلف در چندین آزمایش دیگر نشان داده شده است (۱۵).

ج- خواص آنتی پرولیفراتیو ملاتونین، شاید ملاتونین با مهار روند تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونی، روند تمایز آنها را به اسپرماتوسیت مهار می‌نماید. در تایید این مطلب Glode و همکاران برای اولین بار پیشنهاد نمودند که هر عاملی که بتواند باعث کاهش ترشح FSH و LH شود و بتواند محور هیپوفیزی-هیپوتالاموس-گنادی را مهار کند احتمالاً می‌تواند باعث مهار تقسیم سلول‌های اسپرماتوگونی در طی شیمی درمانی شود. Glode و همکاران ثابت نمودند که درمان با آنالوگ هورمون آزاد کننده گنادوتروپین GnRHa قبل و در طی مصرف سیکلوفسفامید، باعث حفظ روند اسپرماتوژنز در موش می‌شود (۳۲). به طور مشابهی تجویز لوپراید استات (۲۵،۳)، بوسرلین (۳۳)، تستوسترون (۳۴) و همچنین هورمون‌های استروژن و FSH (۳۵) باعث حفظ

اسپرماتوژنز در موش تحت شیمی درمانی با بوسولفان می‌شود؛ که خود این عوامل نیز به نوعی باعث مهار محور هیپوفیزی-هیپوتالاموسی می‌شوند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که بین ملاتونین و گیرنده‌های GnRH در موشها رابطه معکوس وجود دارد و ملاتونین ترشح FSH و LH را کاهش می‌دهد (۳۶). ضمن این که گزارش‌های قبلی نشان‌دهنده این است که ملاتونین دارای خاصیت ضدتکثیری هم روی سلول‌های زایا (۳۷) و هم روی سایر سلول‌های دیگر است (۳۸،۳۹). هرچند که مکانیسم‌های فوق، ثابت شده نمی‌باشند و برای اثبات آنها مطالعات بیشتری در زمینه سلولی، مولکولی و ایمونوهیستوشیمی و همچنین آندوکرینولوژی مورد نیاز می‌باشد.

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز 20 mg/kg بوسولفان، باعث کاهش اسپرماتوژنز و بلوغ سلول‌های ژرمینال و همچنین تغییرات کمی پارامترهای بیضه می‌شود. تجویز ملاتونین به میزان 10 mg/kg ، به مدت ۵ روز از شروع شیمی درمانی به میزان قابل توجهی، تغییرات سوء شیمی درمانی بر اسپرماتوژنز را کاهش می‌دهد و نقش حفاظتی خوبی روی بیضه دارد. این مطالعه پیشنهاد می‌کند که ملاتونین ممکن است نقش مفید و مهمی برای کاربردهای کلینیکی اختلالات کارکردی بیضه به دنبال مصرف داروهای ضد سرطان داشته باشد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گیلان جهت حمایت مالی این مطالعه و با سپاس از سرکار خانم مژگان بشیری کارشناس آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشکده پزشکی، جهت همکاری صمیمانه در زمینه برش، رنگ آمیزی و تهیه اسلایدهای بافت‌شناسی.

1- Follicle Stimulatory Hormone
2- Luteinizing Hormone
3- Gonadotropin Releasing Hormone analogue

References

- Howell SJ, Shalet SM. Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2005;34:12-7.
- Schrader M, Müller M, Straub B, Miller K. The impact of chemotherapy on male fertility: a survey of the biologic basis and clinical aspects. *Reprod Toxicol.* 2001;15(6):611-7.
- Udagawa K, Ogawa T, Watanabe T, Tamura Y, Kita K, Mitsumasa T, Hosaka M. GnRH analog, leuprorelinacetate acetate, promotes regeneration of rat spermatogenesis after severe chemical damage. *Int J Urol.* 2001;8(11):615-22.
- Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(24):11298-302.
- Nagano M, Avarbock MR, Brinster RL. Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient testes. *Biol Reprod.* 1999;60(6):1429-36.
- Brinster CJ, Ryu BY, Avarbock MR, Karagenc L, Brinster RL, Orwig KE. Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation. *Biol Reprod.* 2003;69(2):412-20.
- Brinster RL. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science.* 2002;296(5576):2174-6.
- Sanchez-Hidalgo M, de la Lastra CA, Carrascosa-Salmoral MP, Naranjo MC, Gomez-Corvera A, Caballero B, et al. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp Gerontol.* 2009;44(5):328-34.
- Hussein MR, Abu-Dief EE, Abou El-Ghait AT, Adly MA, Abdelraheem MH. Morphological evaluation of the radioprotective effects of melatonin against X-ray-induced early and acute testis damage in Albino rats: an animal model. *Int J Exp Pathol.* 2006;87(3):237-50.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys.* 2001;34:237-56.
- Sönmez M, Yüce A, Türk G. The protective effects of melatonin and Vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. *Reprod Toxicol.* 2007;23(2):226-31.
- Gavella M, Lipovac V. Antioxidative effect of melatonin on human spermatozoa. *Arch Androl.* 2000;44(1):23-7.
- Gwayi N, Bernard RT. The effects of melatonin on sperm motility in vitro in Wistar rats. *Andrologia.* 2002;34(6):391-6.
- Guneli E, Tugyan K, Ozturk H, Gumustekin M, Cilaker S, Uysal N. Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Eur Surg Res.* 2008;40(4):354-60.
- Ateşşahin A, Sahna E, Türk G, Ceribaşı AO, Yilmaz S, Yüce A, et al. Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *J Pineal Res.* 2006;41(1):21-7.
- Reiter RJ, Tan DX, Sainz RM, Mayo JC, Lopez-Burillo S. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J Pharm Pharmacol.* 2002;54(10):1299-321.
- Lewis-Johnes DI, Kerrigan DD. A modified johnsen's count for evaluation of spermatogenesis in the rat. *IRCS Med Sci.* 1985;13:510-11.
- Redins CA, Redins GM, Novaes JC. The effects of treatment with melatonin on the ultrastructure of mouse Leydig cells: a quantitative study. *Braz J Biol.* 2002;62(3):517-23.
- Bucci LR, Meistrich ML. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. *Mutat Res.* 1987;176(2):259-68.
- Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H, Arfaee AJ. The morphological changes of adult mouse testes after 60Co gamma-Radiation. *Iran Biomed J.* 2008;12(1):35-42.
- van Keulen CJ, de Rooij DG. Spermatogenic clones developing from repopulating stem cells surviving a high dose of an alkylating agent. *Cell Tissue Kinet.* 1975;8(6):543-51.
- Newton SC, Blaschuk OW, Millette CF. N-cadherin mediates Sertoli cell-spermatogenic cell adhesion. *Dev Dyn.* 1993;197(1):1-13.
- Choi YJ, Ok DW, Kwon DN, Chung JI, Kim HC, Yeo SM, et al. Murine male germ cell apoptosis induced by busulfan treatment correlates with loss of c-kit-expression in a Fas/FasL- and p53-independent manner. *FEBS Lett.* 2004;575(1-3):41-51.
- Mohammad Ghasemi F, Soleimanirad J, Ghanbari AA. [An ultrastructural study on the apoptotic features of spermatogenic cells following busulfan treatment in adult mice]. *J Reprod Infertil.* 2007;8(4):319-29. Persian
- Mohamad Ghasemi F. [Ultrastructural evaluation and study of incidence of apoptosis in adult mouse

- testis following treatment with busulfan and GnRH analog supportive therapy] [Dissertation]. [Tabriz]: Tabriz University Of Medical Sciences; 2006 July. Part 3, Results; p. 110-18. Persian.
26. Howell SJ, Shalet SM. Testicular function following chemotherapy. *Hum Reprod Update*. 2001;7(4):363-9.
 27. Qin DN, Lung MA. Morphometric study on leydig cells in capsulotomized testis of rats. *Asian J Androl*. 2002;4(1):49-53.
 28. Mendis-Handagama SM, Kerr JB, De Kretser DM. Experimental cryptorchidism in the adult mouse. III. Qualitative and quantitative electron microscopic morphology of Leydig cells. *J Androl*. 1991;12(5):335-43.
 29. França LR, Godinho CL. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod*. 2003;68:1554-61.
 30. Chatterjee R, Mills W, Katz M, McGarrigle HH, Goldstone AH. Germ cell failure and Leydig cell insufficiency in post-pubertal males after autologous bone marrow transplantation with BEAM for lymphoma. *Bone Marrow Transplant*. 1994;13(5):519-22.
 31. Moisan AE, Foster RA, Betteridge KJ, Hahnel AC. Dose-response of RAG2-/-/gammac-/- mice to busulfan in preparation for spermatogonial transplantation. *Reproduction*. 2003;126(2):205-16.
 32. Glode LM, Robinson J, Gould SF. Protection from cyclophosphamide-induced testicular damage with an analogue of gonadotropin-releasing hormone. *Lancet*. 1981;1(8230):1132-4.
 33. Mohamad Ghasemi F, Bahadori MH, Faghani M, Nasiri E, Soleimani Rad J. [Buserelin inhibits apoptosis in male germ cells induced by busulfan in mouse testis]. *J Iran Anat Sci*. 2009(7):45-54. Persian.
 34. Udagawa K, Ogawa T, Watanabe T, Tamura Y, Kita K, Kubota Y. Testosterone administration promotes regeneration of chemically impaired spermatogenesis in rats. *Int J Urol*. 2006;13(8):1103-8.
 35. Jafarian A, Akhondi MM, Pezhhan N, Sadeghi MR, Zarnani AH, Salehkhoush S. [Stimulatory effects of Estradiol and FSH on the restoration of spermatogenesis in azoospermic mice]. *J Reprod Infertil*. 2008;9(4):317-24. Persian.
 36. Johnston JD, Messenger S, Ebling FJ, Williams LM, Barrett P, Hazlerigg DG. Gonadotrophin-releasing hormone drives melatonin receptor down-regulation in the developing pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(5):2831-5.
 37. d'Istria M, Serino I, Izzo G, Ferrara D, De Rienzo G, Minucci S. Effects of melatonin treatment on Leydig cell activity in the testis of the frog *Rana esculenta*. *Zygote*. 2004;12(4):293-9.
 38. Tam CW, Chan KW, Liu VW, Pang B, Yao KM, Shiu SY. Melatonin as a negative mitogenic hormonal regulator of human prostate epithelial cell growth: potential mechanisms and clinical significance. *J Pineal Res*. 2008;45(4):403-12.
 39. Pizarro JG, Yeste-Velasco M, Esparza JL, Verdagué E, Pallàs M, Camins A, et al. The antiproliferative activity of melatonin in B6 rat dopaminergic neuroblastoma cells is related to the downregulation of cell cycle-related genes. *J Pineal Res*. 2008;45(1):8-16.