ORIGINAL ARTICLE

The Effects of Imedeen on Testicular Histomorphometry of Mice Treated with Cyclophosphamide

Yasin Rezazadeh[1],
Abbas Ahmadi[2]

[1] Veterinary Student, Faculty of Veterinary, Islamic Azad University, Urmia Branch, Urmia,Iran
[2] Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

(Received December 3, 2014 ; Accepted February 8, 2015)

Abstract

Background and purpose: Cyclophosphamide (CP) is a current chemotherapeutic drug which negatively influences the structure of testis. This study aimed to evaluate the protective effects of Imedeen on histological structure of seminiferous tubules and testosterone in CP treated adult mice.

Materials and methods: In this experimental study, 60 mature male mice were assigned to six groups (n= 10 per group).The animals in control group received normal saline, while in other groups the animals were treated with CP 12mg/kg/day, Imedeen in single dose 111µg/kg/day, Imedeen in two dosage 222 µg/kg/day, CP and Imedeen in one dosage, and CP and Imedeen in two dosage, respectively. After 35 days the animals were sacrificed. Histological and histomorphometrical analysis of testis was performed. Serum levels of testosterone were also evaluated.

Results: In CP treated group the histological study of testis confirmed that the percentage of seminiferous tubules with positive tubular differentiation (37.97±2.97), repopulation index (18.50±0.64) and spermatogenesis index (43.74±2.2) were significantly ($P<0.05$) lower than the control and Imedeen treated groups, while Imedeen diminished the adverse effects of CP ($p<0.05$).

Conclusion: These results support the idea that CP can damage the testicular tissue but Imedeen could effectively prevent these adverse effects by inhibiting oxidative processes.

Keywords: Cyclophosphamide, histological, Imedeen, mice, testis

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(122): 282-291 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۲۲ اسفند سال ۱۳۹۳ (۲۹۱-۲۸۲)

بررسی تأثیرات ایمیدین بر روی هیستومورفومتری بیضه در موش‌های سوری تیمار شده با سیکلو فسفامید

یاسین رضازاده[1]

عباس احمدی[2]

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به اثرات مخرب سیکلوفسفامید به عنوان یک داروی رایج در شیمی درمانی بر ساختار بیضه، این مطالعه با هدف تایین اثر حفاظتی ایمیدین بر ساختار بافتی لوله‌های اسپرم‌ساز و تستوسترون موش‌های سوری بالغ در معرض سیکلوفسفامید انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، از ۶۰ قطعه موش سوری نر بالغ در ۶ گروه استفاده شد که گروه کنترل سرم فیزیولوژی، گروه دوم سیکلوفسفامید با دوز ۱۲mg/kg/day، گروه سوم دریافت کننده ایمیدین با دوز ۱۱۱ µg/kg/day، گروه چهارم ایمیدین در دو دوز در دو نوبت ۲۲۲ µg/kg/day، گروه پنجم سیکلوفسفامید و ایمیدین تک دوز و گروه آخر سیکلوفسفامید و ایمیدین را در دو دوز دریافت کردند. پس از ۳۵ روز موش‌ها کشته شدند. آنالیز بافت شناسی بافت بیضه انجام گرفت و سطح سرمی تستسترون اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: در گروه سیکلوفسفامید مطالعات بافت‌شناسی بیانگر این است که درصد لوله‌های اسپرم ساز با تمایز مثبت لوله‌ای (۳۷/۹۷±۲/۹۷) و ضریب جایگزینی (۱۸/۵۰±۰/۶۴) و روند اسپرماتوژنز (۴۳/۷۴±۲/۲) به طور قابل توجهی کم‌تر از گروه کنترل و ایمیدین بوده است. در حالی که استفاده هم زمان سیکلوفسفامید با ایمیدین باعث کاهش عوارض سیکلوفسفامید شد ($p<0/05$).

استنتاج: نتایج حاضر نشان می‌دهد که سیکلوفسفامید می‌تواند باعث آسیب بافت بیضه گردد، اما ایمیدین به طور موثری از طریق مهار فرآیندهای اکسیداتیو باعث از بین رفتن این عوارض می‌شود.

واژه های کلیدی: سیکلوفسفامید، بافت شناسی، ایمیدین، موش سوری، بیضه

مقدمه

بسیاری از داروهایی که به منظور شیمی درمانی سرطان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، در سیستم‌های متعدد بدن اثرات جانبی سمی بر جای می‌گذارد که دستگاه تولید مثلی نر یکی از آن‌ها است. گزارشات بالینی نشان داده‌اند که آسیب سلول های زایای بیضه در بیمارانی که برای دوره محدودی در معرض داروهای شیمی درمانی قرار می گیرند، می‌توانند به نازایی و یا تغییرات ژنتیکی طولانی مدت منجر گردد. بر این اساس دستیابی به راهبردهایی جهت کاهش عوارض سوء داروهای ضد سرطان و در عین حال حفظ کارایی های درمانی این داروها امری ضروری به نظر می‌رسد. عوارض سمی داروی سیکلوفسفامید بر روی بافت بیضه

مولف مسئول: عباس احمدی- ارومیه: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه E-mail: .dr.yasin.rezazadeh@gmail.com

۱. دانشجوی دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اومیه، ارومیه، ایران

۲. استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت :۱۳۹۳/۹/۱۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۹/۱۵ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۱۱/۱۹

نیز که به واسطه تحقیقات متعدد درانسان و حیوانات آزمایشگاهی مورد تأیید قرار گرفته است، بی‌تردید مهم‌ترین عاملی می‌باشد که به شدت کاربردهای درمانی این دارو در مهار بدخیمی‌ها و سرکوب سیستم ایمنی را تحت تأثیر قرار داده است. سیکلوفسفامید[1] به عنوان یک عامل آلکیله کننده[2] و سایتوتوکسیک[3] به‌طور گسترده‌ای در درمان سرطان‌های مختلف و نیز به عنوان یک عامل سرکوب کننده ایمنی در پیوند ارگان‌ها به کار می‌رود(۱). فسفورآمید موستارد[4] و آکرولئین[5] دو متابولیت عمده و فعال سیکلوفسفامید را تشکیل می‌دهد(۲). علی‌رغم کاربردهای وسیع کلینیکی، سیکلوفسفامید موجب بروز اثرات جانبی زیادی از جمله سمیت تولید مثلی در انسان‌ها و حیوانات آزمایشگاهی شده است(۳). گزارشاتی مبنی بر این که سیکلوفسفامید باروری انسان را کاهش می دهد، منتشر شده است. مردانی که به مدت ۴ ماه یا بیش‌تر تحت درمان با سیکلوفسفامید قرار گرفته اند، وضعیت‌های متغیری از الیگواسپرمی یا آزواسپرمی را تجربه کرده‌اند. مطالعاتی که بر روی حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است، نشان می‌دهد که درمان موش‌های سوری نر با سیکلوفسفامید منجر به کاهش وزن بیضه‌ها، الیگواسپرمی گذرا و نیز تغییرات بیوشیمیایی و هیستولوژیک در بیضه‌ها و اپیدیدیم شده است(۴). اگرچه مکانیسم دقیق ایجاد سمیت تولید مثلی و گنادی ناشی از سیکلوفسفامید مشخص نشده است، اما بر اساس نتایج مطالعات متعددی که در گذشته انجام شده، تجویز سیکلو فسفامید می‌تواند تعادل ردوکس[6] را در بافت‌ها بر هم زده و بنابراین باعث ایجاد اختلالات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی ناشی از استرس اکسیداتیو شود(۵).

با توجه به شواهد موجود، تجویز برخی آنتی‌اکسیدان‌ها در طول شیمی‌درمانی به منظور سم‌زدایی بافت‌ها ضروری به نظر می‌رسد و منطقی است که کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز سیکلوفسفامید توسط یک آنتی‌اکسیدان قوی و مطمئن می‌تواند به کم‌تر شدن سمیت تولید مثلی ناشی از آن منجر شود. ایمیدین[7] دارویی است که به عنوان یک روش جدید و یک آنتی‌اکسیدان برای مراقبت از پوست مورد استفاده قرار می‌گیرد. این دارو به عنوان یک آنتی‌اکسیدان، مانع از پیری پوست می‌شود که این تاثیر را با استفاده از تقویت لایه‌های مختلف پوست بر جای می‌گذارد و در سنتز کلاژن و الاستین نقش به‌سزایی دارد. این قرص از سال ۱۹۹۵ در کشورهای اروپایی مورد استفاده قرار گرفته است(۶). ترکیبات ایمیدین شامل کمپلکس دریایی بیومارین است (از ترکیبات اصلی) که غنی از پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدهای مشابه با ساختار پوست می‌باشدکه برای حفظ ساختار طبیعی آن ضروری است. این ماده شامل مقادیر بالایی از اسیدهای آمینه و پپتیدها می‌باشد که به طور مستقیم در سنتز کلاژن و الاستین دخالت دارند. ماده موثره دیگری که در این قرص وجود دارد شامل لیکوفنس جی‌اس می‌باشد که دارای دو نوع آنتی‌اکسیدان بسیار قوی است که از عصاره‌ی گوجه فرنگی و عصاره هسته‌ی انگور به دست می‌آید. عصاره هسته انگور خاصیت آنتی‌اکسیدانی صد برابر قوی تر از ویتامین E دارد که نقش مهمی در دفاع از محیط های چربی دوست نظیر غشای سلولی ایفاء می‌کند. از سوی دیگر عصاره هسته انگور ۵۰ برابر قوی‌تر از ویتامین C می‌باشد. این ماده نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانی در محیط‌های آب دوست نظیر پلاسمای سلولی دارد و در محیط‌هایی که غنی از پروتئین پلی‌ساکارید هستند، تجمع می‌یابد. این قرص به صورت تک دوز یا تک قرص و یا دوز دو برابر یا روزانه دو قرص برای تاثیر بیش‌تر استفاده می‌شود(۷).

با توجه به این یافته‌ها، مطالعه حاضر طراحی شد تا مشخص شود آیا تجویزایمیدین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی می‌تواند از بروز سمیت تولید مثلی و استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز سیکلوفسفامید در موش‌های سوری نر جلوگیری کند یا خیر.

1. Cyclophosphamide
2. Alkylating agent
3. Cytotoxic
4. Phosphoramide mustard
5. Acrolein
6. Redox
7. Imedeen

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از ۶۰ قطعه موش سوری نر بالغ بارور (۸ هفته‌ای) نژاد NMRI با وزن متوسط ۲۰ گرم که باروری آن ها قبلا توسط آمیزش با موش‌های ماده تست شد، استفاده گردید. متعاقب دو هفته سازگاری با محیط با درجه حرارت کنترل شده ۲±۲۲ سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی- ۱۰ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۶۰-۴۰ درصد، به صورت تصادفی در پنج گروه تیمار و یک گروه کنترل تقسیم بندی شدند. حیوانات گروه اول جهت حذف اثر استرس گاواژ به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. این گروه سرم فیزیولوژی به میزان ۰/۲ cc دریافت کردند. در گروه دوم حیوانات سیکلوفسفامید را با دوز ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم با حجم ۰/۲ cc روزانه دریافت کردند. گروه سوم موش‌های دریافت کننده ایمیدین با دوز ۱۱۱ میکروگرم بر کیلوگرم در روز، هم حجم گروه اول بودند. گروه چهارم موش‌هایی بودند که روزی دو دوز ایمیدین به فاصله ۱۲ ساعت دریافت کردند. گروه پنجم روزی یک بار ایمیدین و۴ ساعت بعد از آن سیکلوفسفامید دریافت کردند. گروه آخر نیز روزی دو دوز ایمیدین و ۴ ساعت بعد از دریافت دوز اول ایمیدین، سیکلوفسفامید دریافت کرد. تمامی تجویز داروها به گروه ها به صورت خوراکی از طریق سوند گاواژ و به مدت ۳۵ روز بوده است. سیکلوفسفامید استفاده شده ویال ۵۰۰ میلی‌گرمی با نام تجاری ($Baxter\ ENDOXAN\ 500_{mg}$) و ایمیدین با نام تجاری (IMEDEEN time orefection) بوده است.

پس از طی دوره درمان، اقدام به نمونه‌گیری از موش‌ها گردید که پس از بیهوشی نسبی توسط گاز CO2 و آسان‌کشی، نمونه‌های سرمی و نمونه‌های یافتی از بیضه‌های موش‌های گروه‌های آزمایشی تهیه شده و نمونه‌های سرمی به دست آمده تا زمان آنالیز در دمای ۸۲- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و نمونه‌های بافتی بیضه جهت فیکس شدن در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند.

ارزیابی هیستولوژیکی بافت بیضه

برای بررسی هیستومورفومتری بیضه پس از تهیه مقاطع پارافینی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین، از عدسی چشمی مدرج استفاده شد.

در مطالعه مورفومتریک بافت بیضه، فاکتورهایی نظیر قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، ضریب تمایز لوله‌ای (TDI)[1]، ضریب اسپرمیوژنز (SPI)[2]، ضریب جایگزینی مجدد اسپرماتوگونی‌های فعال (RI)[3] در گروه‌های مختلف مختلف اندازه‌گیری شدند. هم‌چنین تعداد سلول‌های لیدیگ در واحد سطح و تعداد سلول‌های سرتولی در مقطع عرضی ده لوله اسپرم‌ساز با توجه به شکل هسته این سلول‌ها و نیز محاسبه توده‌های اسپرمی در هر لوله شمارش شد. تمامی لام‌ها توسط دو نفر مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفتند.

به منظور ارزیابی اسپرماتوژنز در لوله‌های اسپرم‌ساز، از سه شاخص تمایز لوله‌ای و شاخص جایگزینی مجدد اسپرماتوگونی‌های فعال و شاخص میزان اسپرمیوژنز استفاده گردید. جهت محاسبه شاخص تمایز لوله‌ای، درصد لوله‌های اسپرم‌سازی که شامل سه رده سلول‌های اسپرماتوژنز تمایز یافته از سلول اسپرماتوگونی A بودند، شمارش شدند(۸). برای این منظور در هر بیضه تعداد ۱۰۰ لوله اسپرم‌ساز در ۱۰۰ مقطع عرضی از بافت بیضه مورد بررسی قرار گرفتند. برای محاسبه شاخص جایگزینی نسبت سلول‌های اسپرماتوگونی فعال به سلول‌های اسپرماتوگونی غیر فعال در لوله‌های اسپرم‌ساز محاسبه شدند. به منظور محاسبه ضریب اسپرمیوژنز لوله‌های اسپرم‌سازی که در داخل لومن خود دارای اسپرماتوزوآ بودند، به عنوان لوله‌های با اندکس اسپرمیوژنز مثبت و آن دسته از لوله‌هایی را که دارای لومن خالی از اسپرماتوزوآ بودند، به عنوان لوله‌هایی با اندکس منفی در نظر گرفته شدند. بنابراین ۱۰۰ لوله در ۱۰۰ مقطع عرضی مورد شمارش قرار گرفتند و نتایج به

1. Tubule differentiation index (TDI)
2. Spermiation index (SPI)
3. Repopulation index (RI)

صورت درصد لوله‌های با اندکس اسپرمیوژنز منفی گزارش شد(۹).

اندازه گیری میزان تستوسترون سرم

نمونه‌های خون موش‌های گروه‌های مختلف آزمایشی متعاقب ۳۵ روز پس از اتمام تزریقات و طول درمان و بعد از بیهوشی و قطع ورید وداجی گرفته شد و پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها در ۳۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سرم جدا شد. برای اندازه‌گیری تستوسترون از روش رادیوایمنومتری با استفاده از کیت اختصاصی (DEMEDITEC Testesterone ELISA DE1559 Germany) مورد ارزیابی قرار گرفت و با گروه کنترل مقایسه شد.

آنالیز آماری

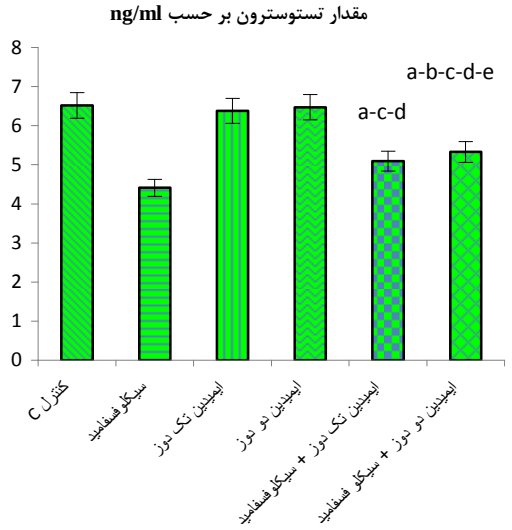
آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار PSS (IBM Co. USA) نسخه شماره ۱۹ و روش آماری One way ANOVA و تست تعقیبی Tukey با p <۰/۰۵ مورد مقایسه قرار گرفته و میانگین و انحراف معیار آن‌ها به دست آمد (p <۰/۰۵).

یافته ها

بررسی نتایج حاصل از شمارش سلول‌های زایا، سلول‌های سرتولی، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، سلول‌های لیدیگ و ارزیابی اسپرماتوژنز در بافت بیضه در گروه‌های مختلف آزمایشی در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه‌های مختلف آزمایشی نشان دادکه تجویز داروی سیکلوفسفامید باعث کاهش معنی‌دار قطر لوله‌ها در گروه درمان شده با این دارو (۱۵۲/۴±۰/۸۳) در مقایسه با چهار گروه دیگر آزمایشی به ویژه گروه کنترل (۱۹۸/۵±۰/۱۹) گشته است. حال آن که تجویز ایمیدین همراه با سیکلوفسفامید در هر دو دوز، باعث افزایش قطر لوله‌ها نسبت به گروه دریافتی سیکلوفسفامید شده است که این افزایش از نظرآماری معنی‌دار می‌باشد (p <۰/۰۵) اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه‌های دریافتی ایمیدین مشاهده نشد (p <۰/۰۵). براساس نتایج حاصل از بررسی ضریب اسپرمیوژنز در گروه های آزمایشی، ضریب اسپرمیوژنز در گروه درمان با سیکلو فسفامید (۴۲/۷۴±۲/۲ درصد) در مقایسه با گروه کنترل (۷۳/۲±۴/۵۸ درصد) از نظر آماری کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد. حال آن که اختلاف بین گروه سیکلوفسفامید با گروه‌های دریافت کننده ایمیدین تک دوز/سیکلوفسفامید (۶۶/۷۸±۱/۴۱ درصد) و ایمیدین دو دوز/سیکلوفسفامید (۷۲/۷۵±۱/۹۸ درصد) از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد (p <۰/۰۵). از سوی دیگر اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های دریافت کننده ایمیدین با گروه کنترل مشاهده نشد. بررسی ضریب تمایز لوله‌ای در گروه‌های آزمایشی جدول شماره ۱ نشان دادکه ضریب تمایز ولهای در گروه درمان شده با سیکلوفسفامید (۳۷/۹۷±۲/۹۷) نسبت به گروه کنترل (۸۵/۵۵±۰/۹) کاهش یافته که این کاهش از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد. مقایسه گروه سیکلوفسفامید با گروه ایمیدین+سیکلوفسفامید نشان دهنده اختلاف معنی‌دار مابین این گروه‌ها می‌باشد (p <۰/۰۵). بر اساس نتایج حاصل از بررسی ضریب جایگزینی سلول‌های اسپرماتوگونی فعال در گروه های آزمایشی جدول شماره ۱، ضریب جایگزینی سلول‌های اسپرماتوگونی فعال در گروه درمان‌شده با سیکلوفسفامید ۱۸/۵±۰/۶۴ درصد و در گروه کنترل ۹۴/۲۵±۱/۳۷ درصد به دست آمد که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه وجود داشت. حال آن که بین گروه سیکلوفسفامید با گروه‌های ایمیدین تک‌دوز+ سیکلوفسفامید (۶۷/۲۵±۱/۱) و ایمیدین دو دوز+ سیکلوفسفامید (۷۱/۵±۱/۱۹) اختلاف معنی داری وجود داشت که ایمیدین سبب افزایش ضریب جایگزینی شده است (p <۰/۰۵).

بررسی‌های بافت‌شناسی و شمارش سلول‌های لیدیگ در واحد سطح مقاطع بافتی تهیه شده از بیضه موش‌های گروه های مختلف مورد آزمایشی نشان

دادکه تعداد این سلول‌ها در ده میلی متر مربع از بافت همبند بینابینی در گروه تیمار شده با سیکلوفسفامید (۱۹۴/۲۵±۲۷/۳۵) کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل (۳۵۸±۳۴/۵۸) داراست. اختلاف معنی‌داری بین دو گروه دریافت کننده ایمیدین با هم و با گروه کنترل وجود نداشت (p <۰/۰۵). شمارش تعداد سلول‌های لیدیگ در گروه‌های دریافت کننده ایمیدین/ سیکلوفسفامید نشان‌دهنده افزایش تعداد این سلول‌ها نسبت به گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید می‌باشد که این اختلاف معنی‌دار می‌باشد (p <۰/۰۵). میانگین پراکندگی سلول‌های سرتولی در مقطع عرضی لوله‌های منی‌ساز بافت بیضه در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید (۵۰/۲۵±۸/۶۱) از نظر آماری کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل (۷۴/۲۵±۲/۱۳) نشان داد. هم‌چنین از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین گروه سیکلوفسفامید و دو گروه دریافت‌کننده سیکلوفسفامید/ ایمیدین با هم وجود داشت که ایمیدین باعث افزایش تعداد این سلول‌ها در گروه‌های دریافتی سیکلوفسفامید شده است. اختلافی بین گروه‌های دریافتی ایمیدین با گروه کنترل مشاهده نشد (p <۰/۰۵). مقایسه نتایج سنجش مقدار سرمی هورمون تستوسترون در گروه‌های مختلف (نمودار شماره ۱) نشان داد که در گروه درمان شده با سیکلوفسفامید، مقدار میانگین این هورمون (۴/۴۱±۰/۱۲) با مقدار میانگین گروه کنترل (۵/۲۶ ± ۰/۲۳) از نظر آماری اختلاف معنی‌داری داشته که در گروه درمان شده با سیکلوفسفامید کاهش محسوسی دیده شد. حال آن که درگروه تیماری ایمیدین در هر دو دوز، میانگین هورمون برابر یا کمی کم‌تر از مقدار میانگین گروه کنترل می‌باشد. مقدار میانگین هورمون در دو گروه تیماری ایمیدین/ سیکلوفسفامید نسبت به مقدار میانگین گروه سیکلوفسفامید و اختلاف معنی‌داری دارند. اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل با دو گروه دریافت‌کننده ایمیدین مشاهده نشد (p <۰/۰۵).



نمودار شماره ۱ : مقایسه مقدار تستسترون درگروه‌های مختلف آزمایشی

حروف موجود در بالای هر ستون بیانگر:

a : اختلاف معنی دار، در مقایسه ی گروه کنترل با سایر گروه ها (p <۰/۰۵).

b: اختلاف معنی دار، در مقایسه گروه سیکلوفسفامید با سایر گروه ها (p <۰/۰۵).

c: اختلاف معنی‌دار، در مقایسه گروه ایمیدین تک دوز با سایر گروه‌ها (p <۰/۰۵).

d: اختلاف معنی‌دار، در مقایسه گروه ایمیدین دو دوز با سایر گروه ها (p <۰/۰۵).

e: اختلاف معنی‌دار، در مقایسه گروه (ایمیدین تک دوز+سیکلوفسفامید) با سایر گروه‌ها (p <۰/۰۵).

جدول شماره ۱: مقایسه پارامترهای مورد نظر در بافت بیضه ی گروه های مختلف آزمایشی

پارامتر / گروه	تعداد سلول های لیدیگ LC	تعداد سلول های سرتولی CC	قطر لوله های منی ساز TD(µm)	ضریب اسپرمیوژنز SPI٪	ضریب تمایز لوله ای TDI٪	ضریب جایگزینی مجدد لوله ای RI%	مقدار تستوسترون (ng/ml)
کنترل	۳۵۸±۳۴/۵۸	۷۴/۲۵±۲/۱۳	۱۹۸/۵±۰/۱۹	۷۳/۲±۴/۵۸	۸۵/۵۵±۰/۹	۹۴/۲۵±۱/۳۷	۶/۵۲±۰/۲۳
سیکلوفسفامید	۱۹۴/۲۵±۲۷/۳۵ a	۵۰/۲۵±۸/۶۱ a	۱۵۲/۴±۰/۸۳ a	۴۳/۷۴±۲/۲ a	۳۷/۹۷±۲/۹۷ a	۱۸/۵۰±۰/۶۴ a	۴/۴۱±۰/۱۲ a
ایمیدین تک دوز	۳۳۷/۷۵±۲۱/۸۴ b	۷۴±۲/۶۷ b	۱۹۲/۹±۰/۰۹ b	۶۴/۸۷±۱/۳۳ b	۸۲/۵۴±۰/۸۹ b	۸۹/۷۵±۱/۲۵ b	۶/۳۸±۰/۰۳ b
ایمیدین دودوز	۳۸۰±۲۲/۷۸ b	۷۸±۲/۳۴ b	۱۹۳/۳±۰/۴۵ b	۶۹/۷۷±۱/۷۸ b	۸۵/۳۳±۱/۵۱ b	۹۰/۷۵±۰/۸۵ b	۶/۴۷±۰/۱۴ b
ایمیدین تک دوز +سیکلوفسفامید	۲۵۰±۱۳/۱۲ d	۵۹/۲۵±۴/۵۵	۱۷۵/۵±۰/۷۳ a-b	۶۶/۷۸±۱/۴۱ b	۴۲/۴۳±۴/۰۱ a-c-d	۶۷/۲۵±۱/۱۰ a-b-c-d	۵/۰۹±۰/۲۱ a-c-d
ایمیدین دو دوز +سیکلوفسفامید	۲۶۸±۲۰/۵ b-c-e	۷۲/۷۵±۲/۱۳ b	۱۹۸/۹±۰/۱۴ b-e	۶۷/۷۵±۱/۹۸ b	۶۱/۴۵±۳/۱۴ a-b-c-d-e	۷۱/۵۰±۱/۱۹ a-b-c-d	۵/۳۳±۰/۰۶ a-b-c-d

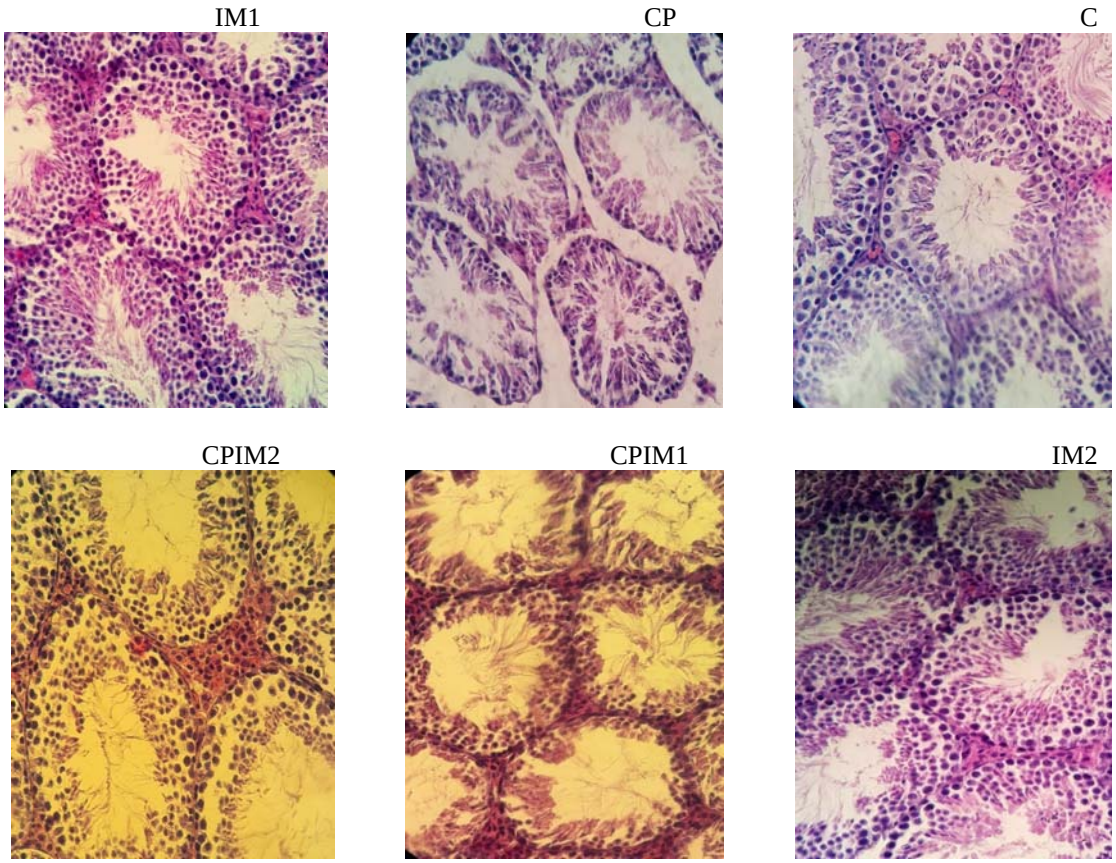
a : بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار، در مقایسه گروه کنترل با سایر گروه ها (p <۰/۰۵).

b: بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار، در مقایسه گروه سیکلوفسفامید با سایر گروه‌ها (p <۰/۰۵).

c: بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار، در مقایسه گروه ایمیدین تک دوز با سایر گروه‌ها

d: بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار، در مقایسه گروه ایمیدین دو دوز با سایر گروه ها (p <۰/۰۵).

e: بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار، در مقایسه گروه (ایمیدین تک دوز+سیکلوفسفامید) با سایر گروه‌ها (p <۰/۰۵).



تصویر شماره ۱: گسیختگی در بافت ژرمینال لوله‌های اسپرم‌ساز در برش عرضی بیضه موش های درمان شده با سیکلوفسفامید که به صورت از بین رفتن انسجام بافتی سلول های ژرمینال و ایجاد فاصله بین آن ها مشخص شده است (CP) که به دلیل اختلال در عملکرد سلول های سرتولی ایجاد شده است. هم چنین در این گروه روند اسپرمیوژنز (تبدیل اسپرماتید به اسپرماتوزوئید) به شدت تنزل پیدا کرده است. سلول های زایگر در گروه های کنترل (C) و ایمیدین تک دوز(IM1) و ایمیدین دو دوز (IM2) به هم پیوسته بوده و گسیختگی در آن دیده نمی شود. انسجام بافتی بهتری در گروه های CPIM1 و CPIM2 نسبت به گروه سیکلوفسفامید قابل مشاهده است. رنگ‌آمیزی H&E. بزرگنمایی (۴۰۰×).

بحث

نتایج آزمایشات بیوشیمیایی و هیستولوژیکی این مطالعه نشان می‌دهد که سیکلوفسفامید باعث بروز سمیت تولیدمثلی می‌شود. پتانسیل و توانایی سیکلوفسفامید و متابولیت سمی آن آکرولئین در تولید ROS و ایجاد پراکسیداسیون چربی و در نتیجه بروز استرس اکسیداتیو درموش سوری در گذشته گزارش شده است. بر این اساس دستیابی به راهبردهایی جهت کاهش عوارض سوء داروهای ضد سرطان و در عین حال حفظ کارایی‌های درمانی این داروها امری ضروری به نظر می‌رسد. عوارض سمی داروی سیکلوفسفامید بر روی بافت بیضه نیز که به واسطه تحقیقات متعدد در انسان و حیوانات آزمایشگاهی مورد تایید قرار گرفته است، بی‌تردید مهم ترین عاملی می‌باشد که به شدت کاربردهای درمانی این دارو در مهار بدخیمی‌ها و سرکوب سیستم ایمنی را تحت تاثیر قرار داده است(۱۰). بررسی‌های بی‌شمار صورت گرفته، مسمومیت ناشی از داروی سیکلوفسفامید در دستگاه تولید مثلی نر را به مکانیسم اکسیدانی نسبت می‌دهند که به واسطه غیرفعال سازی آنزیم‌های میکروزومی توسط این دارو و متابولیت حاصل از آن

یعنی آکرولئین و در نتیجه افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و پراکسیداسیون لیپیدی روی می‌دهد. در مطالعه حاضر نیز کاهش وزن بدن و اندام‌های جنسی به همراه تغییرات سرولوژیک، هیستولوژیک، هیستوشیمیایی و بیوشیمیایی مشاهده شده متعاقب تجویز داروی سیکلوفسفامید، همگی بر مسمومیت دارویی دلالت می‌کنند. همان گونه که در این تحقیق مشاهده شد و مطالعات پیش از این نیز گزارش کرده بودند(۱۱)، تجویز داروی سیکلوفسفامید کاهش معنی‌داری را در وزن بدن و اندام‌های تولید مثلی موش‌های سوری نر موجب می‌گردد. از آن‌جاکه وزن بیضه به میزان زیادی به توده‌های سلولی تمایز یافته موجود در آن وابسته است، کاهش محسوس در تعداد سلول‌های زایا، دژنراسیون و کاهش تعداد سلول‌های لیدیگ و میزان پایین اسپرماتوژنز در ارتباط می‌باشد(۱۲) که این گزارش با یافته‌های هیستولوژیک مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. از سوی دیگر کاهش وزن بیضه و اندام‌های ضمیمه تولید مثلی در حیوانات درمان شده با داروی سیکلوفسفامید می‌تواند بازتابی از کاهش دسترسی به آندروژن‌ها باشد(۱۳). کاهش سطح تستوسترون نیز به نوبه خود قادر است به واسطه کاهش توده‌ی عضلانی و استخوانی موجبات کاهش وزن بدن را فراهم کند(۱۴). از آن‌جاکه استرس‌های توکسیک به واسطه کاهش سطوح آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی کلیدی در سلول‌های لیدیگ به کاهش ترشح تستوسترون منجر می‌گردد(۱۵)، کاهش معنی‌دار درسطوح سرمی تستوسترون متعاقب تجویز داروی سیکلوفسفامید بر اساس یافته های این مطالعه نیز به نظر می‌رسد با نارسایی‌های ایجاد شده در عملکرد سلول‌های لیدیگ به واسطه افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در ارتباط باشد(۱۶). با توجه به این که اسپرماتوژنز در انسان و جوندگان در صورت بروز نقص در حمایت اندوکرینی دچار اختلالات شدید می‌گردد، مهار اسپرماتوژنز در موش‌های سوری نر درمان شده با سیکلوفسفامید می تواند با سطوح پایین تستوسترون در سرم مرتبط باشد. علاوه بر این با توجه به نقش مهم سلول‌های سرتولی در تکامل ساختاری و بلوغ سلول‌ها در بافت بیضه، چنین بر می‌آید که اختلال در اتصال وابسته به تستوسترون سلول‌های سرتولی به سلول‌های زایا که از تجویز داروی سیکلوفسفامید ناشی می‌گردد، می‌تواند روند اسپرماتوژنز را مختل کرده و به از هم گسیختگی اپی‌تلیوم ژرمینال لوله‌های منی‌ساز منجر گردد(۱۷).

نتایج به دست آمده از تحقیقات متعدد تجربی و بالینی کارآیی قابل توجه آنتی‌اکسیدان‌ها را در حفاظت از دستگاه تولید مثلی در برابر اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن و دیگر رادیکال‌های آزاد تولید شده متعاقب تجویز داروی سیکلوفسفامید مورد تایید قرار می‌دهد. این ترکیبات حتی در افزایش توانایی بیماران سرطانی جهت تحمل استرس‌های عمومی ناشی از شیمی درمانی و رادیوتراپی موفق بوده‌اند. مطالعات اخیر نشان داده‌اند ترکیباتی که دارای آنتی‌اکسیدانت‌هایی نظیر ویتامین A,C,E و بتاکاروتن و سلنیوم می‌باشند و جهت درمان نارسایی‌های تولیدمثلی مورد استفاده قرار می‌گیرند، قادرند به واسطه افزایش دادن فعالیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و مهار استرس‌های بیوشیمیایی توکسیک، موجبات کاهش عوارض سوء مصرف داروی سیکلو فسفامید در دستگاه تناسلی را فراهم آورند. مطالعه حاضر نیز نشان داد که داروی ایمیدین به دلیل‌دارا بودن مکانیسمی مشابه آنتی اکسیدان‌هایی نظیرویتامین C,E در مهار و یا کاهش آسیب‌های تولید مثلی ناشی از داروی سیکلوفسفامید در موش‌های سوری موثر می‌باشد. همان‌گونه که پیش‌تر نیز عنوان شد، به نظر می‌رسد فعالیت های آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد این دارو نتیجه عملکرد لیکوفنس جی-اس و کمپلکس بیومارین موجود در آن باشد که تاثیراتی چند برابر بیش‌تر از ویتامین E,C دارند.

نتایج حاصل از مطالعات روز افزون موید این واقعیت است که داروهایی که از ترکیبات طبیعی به

خصوص ترکیبات دریایی ساخته شده و مورد استفاده قرار می‌گیرند، کارایی قابل توجهی در بهبود مسمومیت‌هایی دارند که رادیکال‌های آزاد نقش برجسته‌ای در بروز آن‌ها ایفا می‌کنند. هم‌چنان که قبلا نیز بیان شد، مطالعات زیادی روی این دارو صورت نگرفته است وتنها اطلاعات محدودی در مورد اثرات این دارو بر روی پوست در دسترس می‌باشد، ولی می‌توان گفت این دارو به سبب دارا بودن ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه در توقف روند پیری پوست، افزایش میزان رطوبت پوست، کاهش عروق سطحی و لک‌های ناشی از افزایش سن، جلوگیری از تخریب اجزای پوست و بهبود ساختار آن و از همه مهم‌تر خاصیت ضد سرطانی و مهاری در مقابل رادیکال‌های آزاد و هم‌چنین مهار اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد بر بافت بیضه، روند اسپرماتوژنز واسپرمیوژنز که در مطالعه فوق اطلاعات مفیدی به دست آمد، نقش به سزایی را ایفا می‌کند.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در نهایت، با جمع‌بندی یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که داروی سیکلوفسفامید از طریق بر هم‌زدن تعادل اکسیداسیون- احیاء موجب بروز استرس‌های اکسیداتیو می‌گردد که این استرس‌های بیوشیمیایی توکسیک به واسطه ایجاد اختلال در دسترسی به آندروژن‌ها و متابولیسم انرژی، تحریک آپوپتوز و نیز پی‌ریزی واکنش‌های التهابی و توسعه آن، موجب مسمومیت تولید مثلی دستگاه تولید مثلی نر می‌گردد، حال آن که این مطالعه برای اولین بار نشان داد که داروی ایمیدین به سبب دارا بودن ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه و در نتیجه قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن قادر به ایجاد محافظت نسبی در برابر اثرات نامطلوب داروی سیکلوفسفامید در دستگاه تولید مثلی نر بوده و می‌تواند به عنوان گزینه مناسبی جهت ارتقاء کارکردهای درمانی داروهایی نظیر سیکلوفسفامید به طور هم زمان در روند شیمی درمانی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

در پایان از تمام کسانی که ما را در انجام این مطالعه یاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی صورت می‌گیرد.

References

1. Dollery C. Cyclophosphamide. In: Therapeutic Drugs. 2thed. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1999.
2. Kern JC, Kehrer JP. Acrolein-induced cell death: a caspase influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis. Chem Biol Interact 2002; 139(1): 79-95.
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 1995; 330(1-2): 115-181.
4. Qureshi MS, Pennington JH, Goldsmith HJ. Cox PE. Cyclophosphamide therapy and sterility. Lancet 1997; 2: 1290-1291.
5. Mescher AL. Junqueira's Basic Histology, 12th ed, USA: McGraw-Hill Companies; 2010. p. 1-2.
6. Kieffer M, Esfen J. Imedeen in the treatment of photoaged skin: an efficacy and safety trial over 12 months. J Eu Acad Dermatol Venereol 1998; 11: 129-136.
7. Lassus A, et al. Imedeen for the treatment of degeneratedskin in females. J Int Med Res 1991; 19: 145-157.
8. Malekinejad H, Mirzakhani N, Razi M, Dardmeh F, Alizadeh A, Cheraghi H. Protective effects of Melatonin and Glycyrrhiza glabra extract on ochratoxin A-induced damages on

testes in mature rats. Hum Exp Toxicol 2011; 30(2): 110-123.

9. Malekinegad H, Mirzakhani N, Razi M, Dardmeh F, Alizadeh A, Cheraghi H. Protective effects of melatonin and Glycyrrhiza glabra extract on ochratoxin A-induced damages on testes in mature rats. Hum Exp Toxicol 2011; 30(2): 110-123.
10. 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 1995; 330(1-2): 115-181.
11. Das UB, Mallick M, Debnath JM, Ghosh D. Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide-induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. Asian J Androl 2002; 4(3): 201-207.
12. 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 toxicity using cyclophosphamide and ethinylestradiol-treated rats. J Toxicol Sci 2002; 27(2): 87-96.
13. Plante M, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. Fertil Steril 1994; 62(2): 387-393.
14. Isidori AM, Giannetta E, Greco EA, Gianfrilli D, Bonifacio V, Isidori A, et al. Effects of testosterone on body composition, bone metabolism and serum lipid profile in middle-aged men: a meta-analysis. Clin Endocrinol 2005; 63(3): 280-293.
15. Cox PJ. Cyclophosphamide cystitis-identification of acrolein as the causative agent. Biochem Pharmacol 1979; 28(13): 2045-2049.
16. Das UB, Mallick M, Debnath JM, Ghosh D. Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide- induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. Asian J Androl 2002; 4(3): 201-207.
17. Rezvanfar MA, Sadrkhanlou RA, Ahmadi A, Shojaei-Sadee H, Mohammadirad A, Salehnia A, et al. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. Hum Exp Toxicol 2008; 27(12): 901-910.