مطالعه اثر ملاتونین اگزوژن بر باروری اسپرم در مدل الیگواسپرمی القاء شده با بوسولفان در موش‌های صحرایی پینئالکتومی شده

احد فردوسی خسروشاهی: گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
دکتر مهرداد بختیاری: دانشیار و متخصص آناتومی، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
دکتر جعفر سلیمانی راد: استاد و متخصص آناتومی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
دکتر مرتضی کروجی: استادیار و متخصص آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
دکتر لیلا روشنگر: گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
آتوسا جان زاده:کارشناس ارشد فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده پیراپزشکی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
مهدیه کرداری: دانشجوی پزشکی، گروه علوم پایه، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
***دکتر سید بهنام الدین جامعی:** دانشیار و متخصص آناتومی، دانشکده پزشکی، گروه علوم پایه، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
(*نویسنده مسئول). behnamjameie@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۱/۴/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: بوسولفان از داروهای اختصاصی در درمان سرطان می‌باشد که عوارض جانبی زیادی دارد. از میان آن‌ها می‌توان بـه آسـیب بافـت بیضـه و اختلالات باروری اشاره کرد. برای کاهش عوارض جانبی این داروها هنوز روش درمانی مطمئنی پیدا نشده است. با توجه به نقش حفاظتی ملاتونین، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات ملاتونین اگزوژن در بهبود الیگواسپرمی ناشی از درمان با بوسولفان در بافت بیضه و تاثیر آن بر باروری است.

روش کار: تحقیق حاضر بر روی ۶۰ سر موش صحرایی نژاد ویستار نر بالغ که به طور تصادفی در ۶ گروه شامل کنترل، دریافت کننده بوسولفان، پینئالکتومی، دریافت کننده بوسولفان و ملاتونین، دریافت کننده حلال بوسولفان (DMSO)، پینالکتومی، دریافت کننده بوسولفان و اتانول (حامل ملاتونین) و شم جراحی قرار گرفتند، انجام شده است. بوسولفان به صورت تک دوز (۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) و ملاتونین به مدت ۵۰ روز (۰/۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی (IP) تزریق گردید. پارامتر های اسپرمی شامل تعداد، مورفولوژی و تحرک اسپرم مورد بررسی قرار گرفته، از آن‌ها به روش IVF به منظور تعیین قدرت باروری استفاده شد. نتایج به دست آمده با استفاده نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد آنالیز آماری قرار گرفتند.

یافته‌ها: بوسولفان باعث کاهش معنی دار در تعداد و تحرک و شکل طبیعی اسپرم در مقایسه با گـروه کنتـرل شـد ($p<0/05$). ملاتـونین، باعـث افـزایش معنی‌دار در حفظ پارامترهای معنی دار در حفظ پارامترهای اسپرمی شد ولی بر بهبود قدرت باروری تاثیری نداشته است.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این تحقیق نتیجه گرفته می‌شود که ملاتونین درمانی می‌تواند در درمان برخی از نارسایی‌هـای تولیـد مثلـی ناشـی از شـیمی درمانی در مذکر موثر باشد.

کلیدواژه‌ها: غده پینئال، ملاتونین، الیگواسپرمی، بوسولفان.

مقدمه

یکی از شناخته شده ترین عوارض داروهای ضـد سرطان ایجاد اختلال در روند اسپرماتوژنز می باشد که در موارد زیادی منجـر بـه نابـاروری مـی‌گـردد (۱و۲). به نظر می رسد که اختلال ایجـاد شـده در اسپرماتوژنز پـس از درمـان بـا بوسـولفان ناشـی از خاصیت آلکیله‌کنندگی آن و به طور عمده اثـر آن بر روی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است (۳). همچنـین در مطالعـه عملکـرد ناشـی از فقـدان سلول‌های زایا لوله‌های سمی نفـروس از بوسـولفان استفاده شده است (۴).

مطالعات انجام شده توسط Glode و همکـارانش نشـان مـی‌دهـد کـه مهـار تقسـیم سـلول‌هـای اسـپرماتوگونی و در نتیجـه مهـار تمـایز اسپرماتوگونی‌ها طی شیمی درمـانی، ممکـن اسـت باعث محافظت سلول‌های زایـا و در نتیجـه حفـظ قدرت بـاروری بیمـاران شـود (۵). آن‌هـا پیشـنهاد کردند هر عاملی که بتواند باعث کاهش ترشـح LH و FSH شـود و بتوانـد محـور هیپـوفیزی-هیپوتالاموسـی-گنـادی را مهـار نمایـد، احتمـالاً مـی‌توانـد باعـث مهـار تقسـیم سـلول‌هـای اسپرماتوگونی و در نتیجه حفاظت این سلول‌هـا در

برابر اثرات تخریبی شمی درمانی گردد (۵). دیگر مطالعات انجام شده در این زمینه نشان داده اند که مصرف برخی داروهای آنالوگ هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH)، پس از تخریب شدید سلول‌های زایا به دنبال عوامل گنادوتوکسیک مختلف مانند هگزاندیون، سیکلوفسفامايد و بوسولفان می‌تواند باعث حفظ اسپرم‌زایی در لوله‌های اسپرم ساز شوند (۶و۷). به نظر می رسد استرس اکسیداتیو عامل مهم ایجاد کننده عوارض داروهای شیمی درمانی باشد. Rojansky و همکاران نشان دادند که آنتی‌اکسیدان‌های پلاسما بعد از شیمی درمانی و یا رادیو شیمی درمانی کاهش می یابند که احتمالاً به دلیل استرس اکسیداتیو و افزایش اکسیداسیون اوریک اسید است (۸).

ملاتونین هورمون مترشحه غده پینه ال دارای اثرات آنتی اکسیدان قوی می باشد. غده پینئال نقش مهمی در تنظیم فعالیت نوروانـدوکرینی سیستم تولید مثل انسان ایفا می کند (۹). مطالعات سال های اخیر همچنین نشان داده است که ملاتونین به دلیل دارا بودن گیرنده های ملاتونینی بر روی ساختارهای مختلف مانند: مغز، شبکیه، سیستم قلبی -عروقی بر آن‌ها تاثیر می‌گذارد. همین مطالعات نشان داده اند که به علت وجود این گیرنده ها بر روی سلول‌های اپیدیدیم واسپرماتوزوآ ملاتونین ممکن است دارای نقش حفاظتی در ساختار لیپیدی غشای آن ها داشته و عملکرد میتوکندری های تاژک اسپرم و در نتیجه قدرت تحرک اسپرم ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۸و۱۰).

تحقیقات متعدد دیگری نشان داده است که بین ملاتونین و گیرنده های GnRH در موش ها رابطه مهاری وجود دارد. همچنین ملاتونین ترشح هورمون تحریک کننده فولیکولی (FSH) و هورمون لوتئینیزه کننده (LH) را کاهش داده و باعث تغییر در فیزیولوژی طبیعی محور هیپوتالاموس- هپوفیز – گنادی شود (۱۱). ناباروری ایجاد شده بر اثر داروهای اختصاصی شیمی درمانی مانند بوسولفان مشکلات زیادی را برای بیماران تحت درمان که غالباً در سنین باروری نیز قرار دارند ایجاد می کند. روش‌های حفاظتی مانند فریز کردن بافت بیضه، بالا بردن مقاومت سلول های بنیادی جنسی از جمله روش‌هایی است که در سالیان اخیر مورد توجه متخصصین بالینی و محققان برای کنترل این عارضه قرار داشته است. حفظ و بازتوانی این سلول‌ها طی شیمی درمانی بیشتر از بقیه روش‌ها مورد توجه قرار داشته است. با توجه به نقش حفاظتی ملاتونین و همچنین وجود گیرنده‌های ملاتونینی در بافت بیضه ها، در تحقیق حاضر اثر ملاتونین اگزوژن بر حفاظت و بازتوانی سلول‌های زایا بافت ژرمینال بیضه متعاقب شیمی درمانی با بوسولفان مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش کار

در این مطالعه از ۶۰ سر موش صحرایی ویستار نر بالغ ۲۵۰-۳۰۰ گرمی (انسیتو پاستور، تهران) استفاده شده است. حیوانات به مدت دو هفته در محیط حیوان خانه با دسترسی آزادانه به آب و غذا شرایط محیطی استاندارد و سیکل شبانه روزی ۸:۱۶ نگهداری شدند. حیوانات به طور تصادفی در ۶ گروه و هر گروه ده حیوان قرار داده شدند. گروه های مورد مطالعه شامل گروه کنترل (CTL)، گروه دریافت کننده بوسولفان (BSN) با دریافت تک دوز ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی، گروه پینئالکتومی در یافت کننده بوسولفان و ملاتونین (Px+BSN+MLT) که در آن غده پینئال برداشته شده و ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم بوسولفان و ۰/۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم ملاتونین به میزان تک دوز به صورت داخل صفاقی (IP) دریافت نموده اند، گروه شم بوسولفان (دریافت کننده DMSO حلال بوسولفان) به صورت IP با همان حجم یکسان، گروه پینئالکتومی با دریافت بوسولفان ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم و اتانول (حلال ملاتونین) به عنوان گروه شم ملاتونین، (Px+BSN+Ethanol) و گروه شم جراحی پینئالکتومی بوده اند. به منظور ایجاد مدل الیگواسپرمی از تزریق داروی بوسولفان به صورت تک دوز۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم به

صورت IP استفاده گردید. درمان با ملاتونین اگزوژن با تزریق ملاتونین ۰/۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم به صورت IP روزانه به مدت ۵۰ روز انجام گردید (۱۳و۱۲). با توجه به سیکل شبانه روزی ترشح ملاتونین گروه هایی که ملاتونین دریافت می نمودند در محیط بازسازی شده ریتم شبانه روزی قرار گرفتند و یک ساعت قبل از آغاز تاریکی مصنوعی ایجاد شده، ملاتونین اگزوژن تزریق می گردید (۱۴و۱۵).

جراحی پینئالکتومی

در روش جراحی ابتدا حیوان به روش داخل صفاقی و با داروی کتامین و گزیلازین (۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم گزیلازین + ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم کتامین) بیهوش شده، غده پینئال به روش Hoffman & Reiter برداشته شد. پس از ۴۸ ساعت از جراحی برداشتن پینه ال و تثبیت وضعیت حیوان، درمان با ملاتونین اگزوژن به مدت ۵۰ روز انجام گردید. پس از این مدت حیوانات به روش cervical dislocation قربانی شدند. در تمام نمونه ها ناحیه دم اپیدیدیم سمت چپ خارج شده، مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفت. برای بررسی قدرت باروری از روش IVF استفاده شد.

ارزیابی پارامترهای اسپرم

برای ارزیابی پارامترهای اسپرم، ابتدا اپیدیدیم به پتری دیش حاوی سالین نرمال ۰/۹درصد گرم شده در ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل شد. سپس به منظور خارج شدن اسپرم ها، اپیدیدیم به قطعات کوچک تقسیم گردید و پتری دیش در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO_2 به مدت سی دقیقه قرار داده شد (۱۶).

مطالعه حرکت اسپرم

پس از گذشت نیم ساعت پتری دیش از انکوباتور خارج شد. برای ارزیابی حرکت اسپرم، یک قطره از محلول روی یک اسلاید میکروسکوپی چکانده و سپس روی هر کدام یک لامل قرار داده شد. در هر حیوان حداقل ۵ میدان دید میکروسکوپی با بزرگ نمایی ۴۰۰ برابر مطالعه و درصد اسپرم‌ها از نظر تحرک مشخص شد (۱۶).

مطالعه تعداد اسپرم

۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم روی یک لام نئوبار انتقال داده شده و پس از گذشت چند دقیقه و بی حرکت شدن آن‌ها، تعداد اسپرم‌ها در ۵ خانه شمارش شد و به صورت ۱۰۶ بر میلی لیتر بیان شد.

مطالعه ریخت شناسی اسپرم

یک قطره ۲۰ میکرولیتری از سوسپانسیون اسپرم روی یک اسلاید گسترانده و پس از خشک شدن در هوا در اتانول ۹۶ درجه تثبیت شد و سپس با روش پاپانیکولا رنگ آمیزی شد. پس از چسباندن لامل‌ها روی لام‌ها و خشک شدن آن‌ها در زیر میکروسکوپ با بزرگ نمایی 1000X از نظر ریخت شناسی مورد مطالعه قرار گرفتند. ۲۰۰۰ سلول در هر حیوان بررسی گردیده و مواردی مانند شکل غیرطبیعی سر، دو سر بودن، جدایی سر از دم، مارپیچی بودن دم، دم خمیده و وجود دو دم به عنوان اشکال غیرطبیعی در نظر گرفته شده و به صورت درصد بیان شد (۱۷).

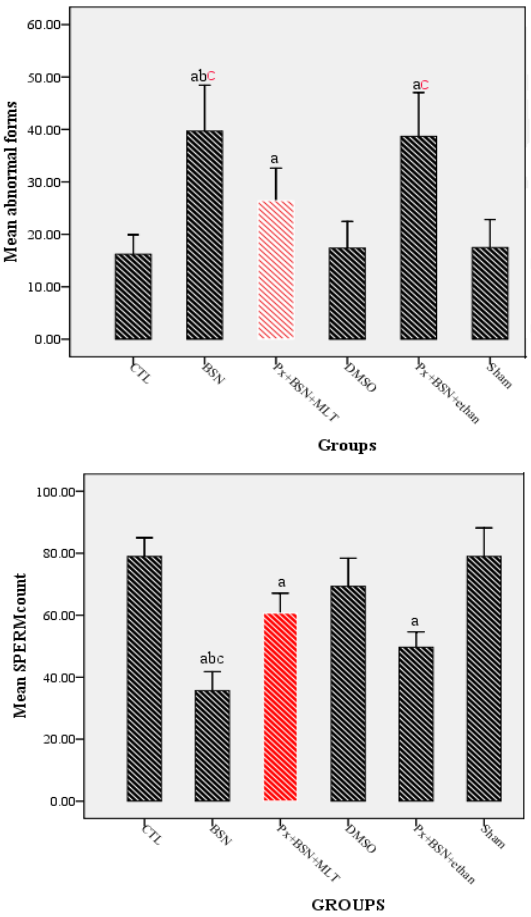
مطالعه قدرت باروری

در این قسمت از مطالعه از موش های صحرایی ماده نژاد ویستار با وزن ۲۰۰-۱۸۰ گرم استفاده گردید. حیوانات در شرایط استاندارد آزمایشگاهی، چرخه تاریکی و روشنایی ۱۲:۱۲ با دسترسی کافی به آب و غذای نگهداری شدند. به منظور دستیابی به حداکثر میزان آزاد سازی تخمک از تحریک تخمک گذاری به کمک هورمون استفاده شد. ابتدا ۱۰ واحد بین المللی هورمون hMG (Merional,IBSA,Switzerland) به صورت IP تجویز شد. این هورمون در محیط داخل بدن به عنوان FSH عمل می کند. بعد از ۴۸ ساعت هورمون hCG (daroopakhsh,Iran) به صورت IP و با دوز ۱۰ واحد بین المللی تزریق شد. این هورمون معادل LH می باشد و برای پاره کردن فولیکول رسیده اهمیت دارد. پس از ۲۴ ساعت

حیوانات قربانی شده، تحت شرایط کاملاً استریل شکم حیوان با برش پوست و صفاق باز گردید، لوله رحمی هر دو طرف از رحم جدا و به داخل دیش حاوی محیط کشت Ham's F-۱۰ استریل منتقل شد. از روش فلاشینگ برای استخراج تخمک استفاده شده، تخمک های به دست آمده جهت انجام IVF مورد استفاده قرار گرفتند.

آماده کردن اسپرم

بدین منظور موش های صحرایی نر بالغ را در گروه‌های مختلف به صورت تصادفی انتخاب کرده و به روش cervical dislocation حیوانات قربانی شده، تحت شرایط استریل با برش طولی شکم باز گردید. پس از کنار زدن صفاق با فشار دادن،



نمودار ۱- مقایسه میانگین تعداد اسپرم و درصد اسپرم های غیر طبیعی در گروه‌های مورد مطالعه CTL(کنترل)، BSN(دریافت کننده بوسولفان)، Px+BSN+MLT (پینئالکتومی + دریافت کننده بوسولفان+ تیمار با ملاتونین)، DMSO (گروه دریافت کننده dmso)، Px+BSN+ethan (پینئالکتومی + دریافت کننده بوسولفان+ اتانول)، Sham (شم جراحی) (p<۰/۰۵).

بیضه‌ها را از اسکلروتوم خارج نموده و اپیدیدیم بیضه را که در مجاورت آن قرار دارد جدا کرده به محیط کشت Ham's F-۱۰ منتقل گردید. سپس اپیدیدیم به قطعات کوچک تر تقسیم شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرار داده شد. سپس محیط حاوی اسپرم توسط پیپت از تکه‌های بزرگ جدا به میکرو تیوپ انتقال یافته، و از آن برای بارور نمودن تخمک های انکوبه شده و القا (IVF) استفاده گردید. بعد از اضافه کردن اسپرم به داخل قطرات حاوی تخمک، دیش‌ها را به مدت ۴۸ ساعت داخل انکوباتور گذاشته تا لقاح در شرایط آزمایشگاهی انجام گیرد و بعد از این مدت جنین‌های حاصله تا ۲-۴ سلولی را در گروه‌های مختلف مطالعه با همدیگر مقایسه گردیدند.

آنالیزهای آماری

نتایج حاصل با استفاده از برنامه آماری SPSS ویراست ۱۶و آزمون ANOVA تحلیل شدند. یافته‌ها تحقیق به صورت میانگین و انحراف معیار بیان و مقادیر (p< ۰/۰۵) معنی‌دار در نظر گرفته شد. همچنین برای ارزیابی تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها از آزمون tukey استفاده شد.

یافته‌ها

پارامترهای اسپرمی شامل تعداد، تحرک، مورفولوژی و انواع حرکت اسپرم (سریع، متوسط، آهسته، درجا) مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی تعداد اسپرم

میانگین تعداد اسپرم در ۲ گروه BSN و Px+BSN+ethanol کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل نشان می دهند (p< ۰/۰۵)، درحالی که برای گروه های دریافت کننده DMSO، Sham و Px+BSN+MLT این اختلاف معنی دار نبوده است. اختلاف بین گروه BSN با گروه دریافت کننده DMSO معنی دار است (p< ۰/۰۵). مقایسه گروه دریافت کننده ملاتونین اگزوژن با گروه بوسولفان نشان داد که تعداد اسپرم ها در گروه تیمار با

ملاتونین به صورت معنادار بیشتر از گروه بوسولفان است (p< ۰/۰۵) (نمودار ۱).

بررسی تحرک اسپرم

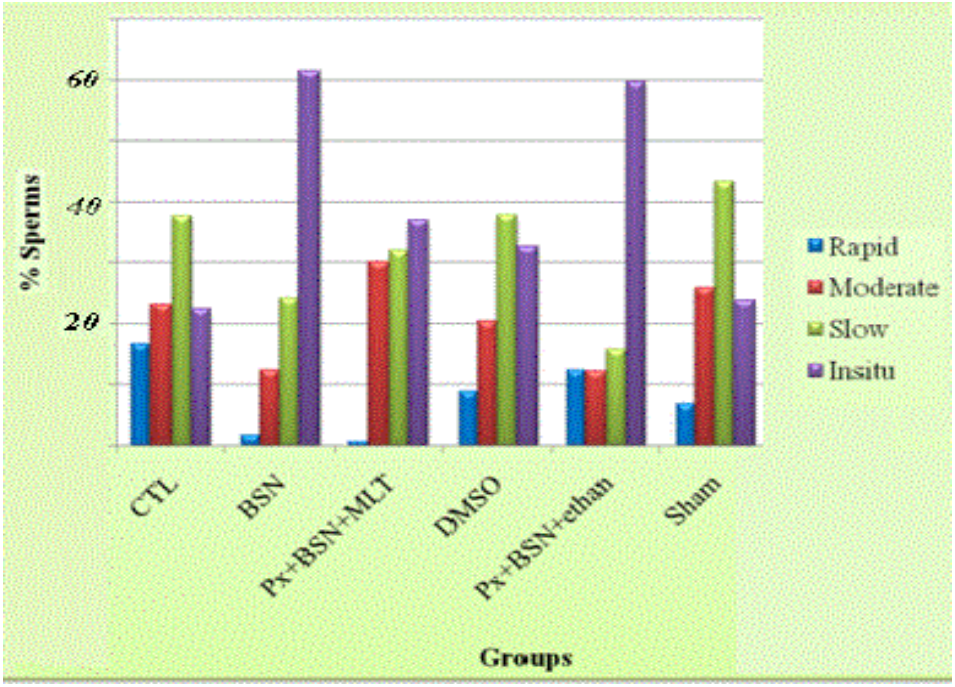
مقایسه میانگین تعداد اسپرم‌های متحرک بین گروه‌های مختلف نشان دهنده کاهش معنی‌دار در گروه‌های BSN و Px+BSN+ethan نسبت به گروه کنترل می باشد. همان طور که نمودار ۲ نشان می‌دهد، تعداد اسپرم های متحرک در گروه Px+BSN+MLT به صورت معناداری بیشتر از گروه BSN و Px+BSN+ethan بود (p< ۰/۰۵). این نمودار همچنین درصد انواع اسپرم های سریع، متوسط، آهسته و درجا در گروه های مختلف را نشان می دهد. درصد اسپرم های با حرکت سریع در دو گروه BSNو Px+BSN+MLT در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی دار کمتر می باشد. افزایش درصد اسپرم های با حرکت سریع در گروه ملاتونین اگزوژن نسبت به گروه شم اتانول و DMSO نیز بیشتر است که از نظر آماری معنی دار می باشد (p< ۰/۰۵).

بررسی مورفولوژی اسپرم

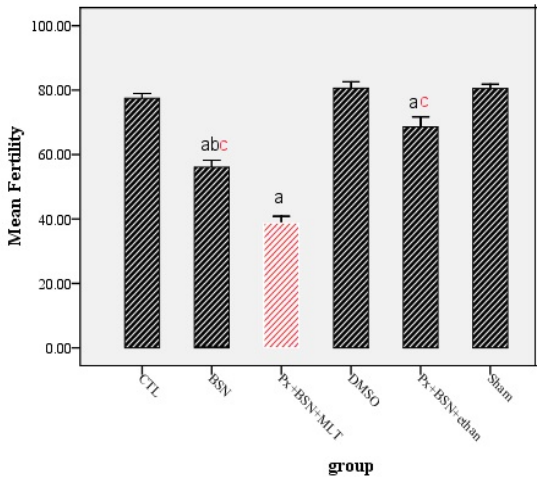
تعداد اسپرم های با اشکال غیر طبیعی در گروه‌های بوسولفان (BSN)، شم بوسولفان (Px+BSN+ethan) و دریافت کننده ملاتونین (Px+BSN+MLT) به صورت معنی‌داری بیشتراز گروه کنترل می باشد. همچنین مقایسه گروه Px+BSN+MLT با گروه مدل BSN، Px+BSN+ethan کاهش معنی‌داری در گروه آزمایش تحت تیمار ملاتونین را نشان می‌دهد که نشانه بهبودی در اشکال غیز طبیعی اسپرم‌ها تحت تیمار ملاتونین بود (نمودار ۱).

بررسی درصد باروری

از نظر میزان باروری در محیط کشت (IVF)، نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد که بیشترین درصد باروری تخمک‌ها در گروه کنترل و شم (Px+BSN+ethan) رخ داده است و دو گروه بوسولفان و دریافت کننده ملاتونین (Px+BSN+MLT) با درصد کمتر و معنی دار بعد از گروه کنترل و شم قرار گرفته اند. تفاوت مابین گروه بوسولفان BSN با گروه دریافت کننده ملاتونین



نمودار۲- تغییرات میانگین درصد اسپرم با تحرک سریع، متوسط، آهسته و بی حرکت در گروه های مختلف: CTL(کنترل)، BSN (دریافت کننده بوسولفان)، Px+BSN+MLT (پینئالکتومی + دریافت کننده بوسولفان+ تیمار با ملاتونین)، DMSO(گروه دریافت کننده dmso)، Px+BSN+ethan (پینئالکتومی + دریافت کننده بوسولفان+ اتانول)، Sham (شم جراحی) (p< ۰/۰۵).



نمودار۳- تخمک های بارور شده و مقایسه درصد باروری آن‌ها در گروه‌های مختلف: CTL (کنترل)، BSN (دریافت کننده بوسولفان)، Px+BSN+MLT (پینئالکتومی + دریافت کننده بوسولفان+ تیمار با ملاتونین)، DMSO (گروه دریافت کننده dmso)، Px+BSN+ethan (پینئالکتومی + دریافت کننده بوسولفان+ اتانول)، Sham (شم جراحی)، Px+BSN (پینئالکتومی + دریافت کننده بوسولفان) (p< ۰/۰۵).

a. در مقایسه با گروه کنترل در همان ستون از نظر آماری معنی دار است.

b. مقایسه گروه BSN با گروه DMSO (شم بوسولفان) در همان ستون از نظر آماری معنی دار است.

c. مقایسه گروه های مدل الیگواسپرم با گروه Px+BSN+MLT به عنوان گروه آزمایش در همان ستون از نظرآماری معنی دار است (BSN، Px+BSN+ethan، Px+BSN گروه های مدل در نظر گرفته شده اند) (p< ۰/۰۵).

(Px+BSN+MLT) کاهش معنی داری در درصد تخمک های بارور شده در گروه اخیر را نشان می‌دهد (p< ۰/۰۵) (نمودار ۳، شکل ۱).

بحث و نتیجه گیری

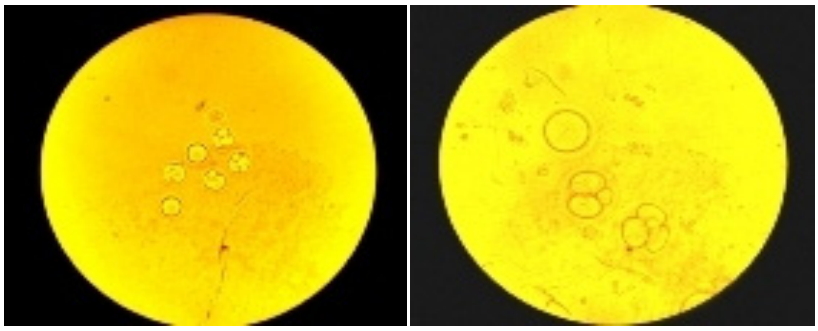
در مطالعه حاضراثر بوسولفان و ملاتونین بر پارامترهای اسپرم و قدرت باروری اسپرم‌ها که شاخص‌های مهمی برای کیفیت باروری مذکر است، مورد مطالعه قرار گرفت.

بوسولفان باعث کاهش تعداد اسپرم ها و افزایش تعداد اسپرم های غیرطبیعی شد. Bucci و همکاران نیز نتایج مشابهی را گزارش نمودند، آن‌ها همچنین بیان نمودند که علت این تغییرات می تواند ناشی از آثار آلکیله کنندگی بوسولفان بر سلول‌های اسپرماتوگونی باشد که با افزایش P53 باعث القای آپوپتوز می شود (۱۳و۱۴). mRNA P53 در اسپرماتوست ها و اسپرماتوگونیا افزایش می یابد و بر مرحله پروفاز میوز اثر می گذارد (۱۸). مطالعات انجام شده توسط Monesi نشان داد که سنتز DNA قبل از شروع تقسیم میوز رخ می دهد و سنتز دوباره‌ای طی دوره اسپرماتوژنز رخ نمی‌دهد (۱۹). بنابراین احتمال دارد بوسولفان روی اسپرماتوگونی‌ها اثر کرده باشد و به همین دلیل شکل اسپرم‌ها پس از گذشت ۵۰ روز از شروع درمان، دچار تغییر شده‌اند.

همچنین نشان داده شده است که بوسولفان باعث از بین رفتن رده اسپرماتوگونی A شده و بیشترین تأثیر آپوپتوتیک آن روی اسپرماتوگونی و سپس، اسپرماتوسیت های اولیه است (۱۴و۱۵). علاوه بر این Bucci و همکاران مورفولوژی غیر طبیعی و موتاسیون اسپرمی متعاقب به کار بردن بوسولفان را نشان داده اند (۱۳). این که بوسولفان با چه مکانیزمی بر روی پارامترهای اسپرمی تاثیر می‌گذارد مورد بحث محققین قرار داشته است. کاهش سطح پلاسمایی تستسترون متعاقب درمان با بوسولفان گزارش شده است. همچنین نشان داده شده است که سلول‌های اسپرماتوگونی دارای رسپتور آندروژنی هستند. به نظر این محققین کاهش سطح تستسترون از طریق down regulation (فرو تنظیمی) گیرنده ها باعث تغییرات پارامترهای اسپرمی و حتی مرگ سلول های اسپرماتوگونی می‌شود (۱۲، ۲۰ و ۲۱).

کاهش تحرک اسپرم تحت تاثیر بوسولفان که در تحقیق حاضر نیز مشاهده گردید ممکن است ناشی از اثر دارو بر فلاژل (mtDNA) و یا آسیب به میتوکندری به عنوان ارگانل مهم برای تحرک اسپرم و تامین ATP باشد (۲۲و۲۳). اکسیدکننده‌هایی مثل H_2O_2 و P باعث القا اپوپتوز وابسته به میتوکندری در اسپرماتوزوئید ejaculated انسان می‌شود (۲۴). استرس اکسیداتیو از دیگر عوامل القا کننده آپوپتوز می باشد (۲۵). استرس اکسیداتیو زمانی که تولید ROS بیش از حد افزایش می یابد باعث صدمه به اسپرم می‌شود (۲۶). به دلیل اینکه اسپرماتوزوها سیتوپلاسم کمی دارند که حاوی آنتی اکسیدان می‌باشد بسیار به آسیب های ناشی از افزایش ROS حساس می باشند (۲۷).

تحقیقات نشان داده اند که داروهای شیمی درمانی مثل بوسولفان باعث افزایش تولید اکسیدکننده‌ها و



شکل ۱- نشان دهنده اووسیت های لقاح یافته در محیط کشت(IVF)

ایجاد استرس اکسیداتیو می شوند (۲۸). مطالعات انجام شده توسط DeLeve LD, Wang X. نشان داد که درمان با بوسولفان سطح آنتی اکسیدان‌های طبیعی بدن مانند گلوتاتیون را کاهش داده، می تواند منجر به مرگ سلولی شود (۲۹). نتایج این تحقیق نشان داد که ملاتونین قادر به اعاده برخی پارامترهای اسپرمی متعاقب درمان با بوسولفان می‌باشد. این یافته با مطالعات قبلی درمان اختلالات اسپرماتوژنز به وسیله ملاتونین در نمونه‌های پینئالکتومی نشده همخوانی دارد (۱۷).

در سالیان اخیر به نقش ملاتونین به عنوان یک آنتی اکسیدان بسیار مؤثر و قوی و خنثی کننده رادیکا ل‌های آزاد توجه فراوانی شده است. نشان داده شده است که ملاتونین به دلیل داشتن اندازه کوچک و خاصیت چربی دوستی زیاد به راحتی از غشا ی سلول عبور کرده و در کل سلول پخش شده و DNA را در برابر عوامل مخرب حفظ می نماید (۳۰). ملاتونین با اتصال به گیرندهای مختلف خود تقریباً بر روی تمام سلول ها دارای اثر می باشد (۳۱). نوع MT1/MT2 گیرنده‌های ملاتونینی بر روی اسپرماتوزوا شناسایی شده اند که گفته می شود نقش زیادی در کاهش اپوپتوز القا شده توسط H_2O_2 دارند (۳۲). علاوه بر نقش گیرنده‌های ملاتونینی نشان داده شده است که ملاتونین و یا متابولیت های آن قادر به خنثی نمودن رادیکال‌های آزاد می باشند (۳۳). همچنین نشان داده شده است که فعالیت آنتی اکسیدانی و پروتکتیو ملاتونین به افزایش بیان ژن های موثر در سنتز آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند سوپر اکساید دیس موتاز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پر اکسیداز مرتبط می‌باشد (۳۴). نتایج مشابهی نیز برای اثرات آنتی اکسیدانی و پروتکتیو ملاتونین بر سلول های اسپرماتوگونی و بافت بیضه در موش های دیابتیک و موش های در معرض اشعه X ارائه شده است (۳۷-۳۵).

اینکه چرا ملاتونین درمانی علی رغم اعاده پارامترهای اسپرمی نتوانسته است اثری بر روی قدرت باروری اسپر مها داشته باشد برای محققین طرح حاضر چندان مشخص نمی باشد. هر چند که پروسه لقاح تا حد زیادی به طبیعی بودن پارامترهای اسپرمی بستگی دارد، اما فرآیند لقاح و باروری و توان اسپرم برای عبور از سد تخمک فرآیند بسیار پیچیده سلولی و مولکولی است که ملاتونین ممکن است بر هر قسمت از ان اثر نموده باشد. بررسی این قسمت نیاز به تحقیق گسترده دیگری دارد که در آن مکانیزم های مولکولی لقاح و تاثیرات ملاتونین بر آن‌ها باید مورد بررسی قرار گیرند. رسپتورهای اتصالی برای اتصال به تخمک، واکنش اکروزومیک و توان عبور اسپرم از لایه های تخمک از جمله مراحلی هستند که ممکن است تحت تاثیر ملاتونین اگزوژن تغییر یابند.

بر اساس نتایج تحقیق حاضر می توان چنین نتیجه گرفت که ملاتونین اگزوژن بر روی پارامترهای اسپرمی و نه بر توان باروری اسپرم و لذا بر نتیجه باروری متعاقب شیمی درمانی با بوسولفان در مدل بیولوژیک تاثیر گذار می باشد. به نظر می رسد که ملاتونین بتواند تاثیرات مشابهی را در رفع عوارض ثانویه ناشی از شیمی درمانی بر فیزیولوژی تولید مثلی در انسان نیز داشته باشد که نیازمند بررسی‌های بیشتر می باشد. محققین ادامه تحقیق بر نمونه های داوطلب انسانی را که تحت شیمی درمانی می باشند، توصیه می نمایند.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام پذیر گردیده است. نویسندگان از این معاونت و همچنین پرسنل آزمایشگاه علوم پایه دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران و تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

1. O'Dwyer l. Anderson PHO Knoben JE, Troutman WG. Handbook of clinical data. 10th ed. CITY: Mc Graw Hill; 2002.
2. Trevor AJ, Katzung BG, Masters SB. A long medical book Katzung & Trevors Pharmacology examination and board review. 6th ed. Mc Graw Hill; 2002.
3. Jansz GF, Pomerantz DK. The effect of prenatal treatment with busulfan on in vitro androgen production by testes from rats of various ages. Can J Physiol Pharmacol. 1985; 63(9):1155-8.
4. Honaramooz A, Behboodi E, Hausler CL, Blash S, Ayres S, Azuma C, Echelard Y, Dobrinski I. Depletion of endogenous germ cells in male pigs and goats in preparation for germ cell transplantation. J Androl.2005; 26(6):698-705.
5. Fossa SD, Magelssen H. Fertility and reproduction after chemotherapy of adult cancer patients: malignant lymphoma and testicular cancer. Ann Oncol. 2004; 15:iv259–iv65.
6. Glode LM, Robinson J, Gould SF. Protection from cyclophosphamide induced testicular damage with an analogue of gonadotropin-releasing hormone. The Lancet. 1981; 23: 1132-4.
7. Meistrich ML, Wilson G, Kangasniemi M, Huhtaniemi I. Mechanism of protection of rat spermatogenesis by hormonal pretreatment: stimulation of spermatogonial differentiation after irradiation. J Androl. 2000; 21:464–9.
8. Rojansky N, Brzezinski A, Schenker JG. Seasonality in human reproduction: an update. Hum Reprod. 1992; 7:735-45.
9. Meistrich ML, Guanapala SH. Focus on fertility preservation, Hormonal suppression for fertility preservation in males and females. Reproduction. 2008; 136: 691-701.
10. Gavella M, Lipovac V. Antioxidative effect of melatonin on human spermatozoa. Arch Androl.2000; 44(1):23-7.
11. Ozlem Y, Ozbek E. Potential chemoprotective effect of melatonin in cyclophosphamide- and cisplatin-induced testicular damage in rats. Fertil Stril.2009; 92:1124-32.
12. Johnston JD, Messager S, Ebling FJP, Williams LM, Barrett P. Gonadotropin releasing hormone drives melatonin receptor down-regulation in the developing pituitary gland. PNAS. 2003; 100(5):2831-5.
13. Saalu LC, Togun VA, Oyewopo AO,Raji Y. Artificial cryptorchidism and the moderating effect of melatonin in sprague-dawley rats. J. Applied Sci. 2006; 2889-94.
14. Morgan PJ, Williams LM. Central melatonin receptors: implications for a mode of action. Experientia.1989; 45:955-96.
15. Namboodiri MA, Valivullah HM, Moffet JR. Regulation of melatonin synthesis in the ovine pineal gland. Adv Exp Med Biol.1991; 294:137–48.
16. Ebrahimi-kalan A. Study on the effects of ginseng on Busulfan-induced disorder in germinal epithelium and semen parameters. MsD thesis in anatomy. Tabriz: Medical Sciences Faculty, Tabriz Medical Sciences University. 2009; 44.
17. Mohammad ghasemi F, Bahadori MH, Faghani M, Nasiri Ebrahim, Soleimani Rad J. Anti apoptotic effect of Buscerelin on apoptosis of male germ cells induced by busulfan in mouse testis. J Iran Anat Sci. 2009; 27:45-54.
18. Beumer TL, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, van Buul PP, Gil-Gomez G, Rutgers DH et al. The role of the tumor suppressor p53 in spermatogenesis. Cell Death Differ. 1998; 5: 669–77.
19. Ibin-Bibin A, Tatwei T, Ishii M,

29. DeLeve LD, Wang X. Role of oxidative stress and glutathione in busulfan toxicity in cultured murine hepatocytes. Pharmacology. 2000; 60:143-54.

30. Monesi V. Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine. J Cell Biol.1962; 14:1-18.

31. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptor in mammals. Endocrine. 2005; 27:101–10.

33. Acu~na-Castroviejo D, Escames G, Rodrıguez MI, L_opez LC. Melatonin role in the mitochondrial function. Front Biosci. 2007; 12:947–63.

32. Radogna F, Cristofanon S, Paternoster L, D'Alessio M, De Nicola M, Cerella C, et al. Melatonin antagonizes the intrinsic pathway of apoptosis via mitochondrial targeting of Bcl-2. J Pineal Res. 2008; 44:316–25.

34. 34- Fouchécourt S, Lareyre JJ, Chaurand P, DaGue BB, Suzuki K, Ong DE, et al. Identification, immune-localization, regulation, and postnatal development of the lipocalin EP17]epididymal protein of 17 kilodaltons in the mouse and rat epididymis. Endocrinology. 2003; 144:887-900.

35. León J, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunctions. J Pineal Res. 2005; 38:1-9.

36. 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; 13:519-22.

37. Ramanathan B, Archunan G. Analysis of epididymal proteins during sexual maturation in male albino mice. Acta Physiol Hung.2001; 88:73-80.

Mohammad Abdul A, Yoshiakira k, et al. An ultra structural study on cytotoxic effect of mono (2-ethlyhexyl) phthalate (MEHP) on testes in Shiba goat in vitro. J Vet Sci. 2004; 5(3):235-40.

20. Shetty G, Meistrich ML. Hormonal approaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment. J Natl Cancer Inst Monogr. 2005; 34:36-9.

21. D.N T, G.B J. Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells. Toxicology. 2008; 248(2-3):96-103

22. Bucci LR, Meistrich ML. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. Mutat Res.1987; 176:259-68.

23. 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/fas L and p53 independent manner. FEBS Lett. 2004; 575:41-51.

24. Bejarano I, Lozano GM, Ortiz A, Garc_a JF, Paredes SD, Rodr_guez AB, et al. Caspase 3 activation in human spermatozoa in response to hydrogen peroxide and progesterone. Fertil Steril. 2008; 90:1340–7.

25. Agarwal A, Allamaneni SS. The effect of sperm DNAdamage on assisted reproduction outcomes: a review. Minerva Ginecol. 2004; 56:235–45.

26. Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. Indian J Exp Biol. 2005; 43:963-74.

27. Henkel R. The impact of oxidants on sperm function. Andrologia. 2005; 37:205-6.

28. Gonçalves TL, Benvegnú DM, Bonfanti G, Frediani AV, Pereira DV, Rocha JB. Oxidative stress and delta-ALA-D activity in different conditioning regimens in allogeneic bone marrow transplantation patients. Clin Biochem. 2009; 42:602-10.

Study of the effect of exogenous melatonin on sperm fertility in busulfan induced oligospermic of pinealectomeized rat

Ahade Ferdosi Khosroshahi, MSc. Anatomy group, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
Mehrdad Bakhtiari, PhD. Associate Professor of Anatomy, Anatomy group, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Jafar Soleimani Rad, PhD. Professor of Anatomy, Anatomy group, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
Morteza Koroji, PhD. Assistant Professor of Anatomy, Anatomy group, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Leila Roshangar, PhD. Anatomy group, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
Atousa Janzadeh, MSc. Basic Science Department, Faculty of Allied Medicine, Physiology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Mahdieh Kerdari, Medical student. Basic Science Department, Faculty of Allied Medicine, Physiology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
***Behnamedin Jameie,** PhD. Associate Professor of Anatomy, Anatomy Depatment, Faculty of Medicine, Basic Science Department, Faculty of Allied Medicine Physiology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding author). behnamjameie@tums.ac.ir

Abstract

Background: Busulfan is drug of choice for treatment of certain cancers with well-known side effects. Infertility and testes tissue damage are known side effects. There is still no effective therapy to reduce these effects. Melatonin is a potent antioxidant with protective effects on certain tissues. The aim of this study was to evaluate the protective effects of exogenous melatonin on busulfan induced oigospermia and fertility of pinealectomized rat.
Methods: Sixty adult Wistar rats weighing 250-300 gr were used in this study. The animals were randomly divided into 6 groups: control, busulfan treatment, busulfan vehicle treatment, pinealectomized with busulfan and melatonin treatment, surgical sham, pinealectomized with busulfan and melatonin vehicle. Pinealectomy was done. Intraperitoneal injections of single dose of busulfan (20mg/kg) and melatonin (0.5mg/kg) for 50 days were administered. Animals were sacrificed and sperm parameters including sperm motility, count and morphology was evaluated. IVF technique was used to determine sperm fertility. The data were analyzed and presented in mean ± SD, Pv less than 0.05 was considered significant.
Results: Busulfan significantly reduced sperm count, motility and fertility. It also caused sperm morphological changes ($p<0.05$). Melatonin treatment recovers the effects of busulfan on sperm parameters but not the fertility feature.
Conclusions: Based on our results melatonin therapy might be useful to treat certain reproductive dysfunction in male followed by chemotherapy.

Keywords: Pineal gland, Oligospermia, Busulfan, Melatonin.