Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2015; 18(95): 25-32

Protective effects of imedeen on spermatogenic disorders caused by oxidative stress induction in cyclophosphamide-treated mice.

Rezazadeh Y[1], Ahmadi A[2]*

1- Department of veterinary, Urmia Branch, Islamic Azad University,Urmia,Iran
2- Department of Basic Sciences, Faculty of veterinary, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 30 Nov 2014, Accepted: 28 Jan 2015

Abstract

Background: One of the side effects of chemotherapy drugs is oxidative stress that can damage the sperm and decrease fertility potential. Antioxidant agents in Imedeen like Lycophence GS and Biomarine complex play important role in preventing the direct and indirect effects of free radicals. So, in this study, the inhibitory effects of Imedeen on the damage caused by cyclophosphamide were investigated.

Materials and Methods: In this experimental study, 60 mature male mice were divided into six groups. The control group received physiological serum, the second group received CP with 12mg/kg/day dosage, the third group received Imedeen with 111µg/kg/day dosage, the fourth group received Imedeen with 222 µg/kg/day dosage, the fifth group received CP and Imedeen with one dosage and the last group received CP and Imedeen with double dosage. Sampling and studies on sperm quality were performed after 35 days.

Results: The results obtained from the caudal epididymal sperm analysis revealed that treated with CP caused significant decrease in sperm count, motility, and viability, while abnormal sperms increased as compared to control gruop. These changes were associated with significant increase in DNA damage and chromatin abnormality in the caudal epididymal spermatozoa as evidenced by Acridine Orange and Aniline Blue staining respectively. Notably administration of Imedeen caused a considerable recovery in above-mentioned parameters.

Conclusion: The results suggest that Imedeen as an antioxidant could diminish the side effects of cyclophosphamide in the reproductive system of male mice.

Keywords: Cyclophosphamide, Imedeen, Mouse, Oxidative stress, Sperm

*Corresponding Author:
Address: Department of Basic Sciences, Faculty of veterinary, Urmia University, Urmia, Iran
Email: abbasahmadi60@yahoo.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۸، شماره ۲ (شماره پیاپی۹۵)، اردیبهشت ۱۳۹۴،۳۲-۲۵

اثرات محافظتی ایمیدین بر اختلالات اسپرماتوژنز ناشی ازاسترس اکسیداتیو در موش‌های سوری درمان شده با سیکلوفسفامید

یاسین رضازاده[۱]، عباس احمدی[۲]*

۱- دانشجوی دکترای دامپزشکی، گروه دامپزشکی، دانشگاه آزاداسلامی واحد ارومیه، ارومیه،ایران

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

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۹ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۸

چکیده

زمینه و هدف: یکی از عوارض جانبی داروهای شیمی درمانی، استرس اکسیداتیو است که می‌تواند موجب آسیب بر اسپرماتوزوئیدها وکاهش توان باروری شود. عوامل آنتی‌اکسیدانتی موجود در ایمیدین، همانند لیکوفنس جی-اس و کمپلکس بیومارین نقش بسیار مهمی در جلوگیری از اثرات مستقیم و غیرمستقیم رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کنند. از این رو، در این مطالعه اثرات مهاری ایمیدین بر آسیب‌های ناشی از سیکلوفسفامید بررسی 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 روزانه ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم، گروه سوم ایمیدین با دوز روزانه ۱۱۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم، گروه چهارم دو نوبت ایمیدین در دو دوز، گروه پنجم سیکلوفسفامید و ایمیدین تک دوز و گروه آخر سیکلوفسفامید و ایمیدین را در دو دوز دریافت کردند. پس از ۳۵ روز، نمونه‌برداری انجام شد و مطالعات مورد نظر روی کیفیت اسپرم صورت گرفت.

یافته‌ها: داده‌های به دست آمده حاصل از آنالیز اسپرم دم اپیدیدیم نشان داد که تجویز سیکلوفسفامید باعث کاهش چشمگیر تعداد، تحرک و قابلیت زیست‌پذیری اسپرم می‌شود. این در حالی است که اسپرم‌های غیرطبیعی در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. این تغییرات با افزایش قابل توجه آسیب DNA و اختلال درکروماتین اسپرم دم اپیدیدیم همراه بود که از طریق رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و آنیلین بلوقابل شناسایی بود. نکته مهم این است که ایمیدین باعث بهبود بسیار زیاد پارامترهای ذکر شده گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از آن است که ایمیدین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت می تواند عوارض جانبی سیکلوفسفامید در دستگاه تولید مثل موش‌های نر سوری را کاهش دهد.

واژگان کلیدی: سیکلوفسفامید، ایمیدین، موش سوری، استرس اکسیداتیو، اسپرم

* **نویسنده مسئول:** ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه

Email: abbasahmadi60@yahoo.com

مقدمه

امروزه در جوامع مختلف، نگرانی رو به رشدی درباره پیامدهای اثرات سوء داروها و مواد سمی مختلف بر سیستم تولید مثل سلول‌های جنسی به وجود آمده است. در طول فرآیند اسپرماتوژنز، سلول‌های جنسی نر مراحل تکاملی مختلفی را طی می‌کنند که در طول این مراحل می‌توانند به وسیله یک ماده سمی مورد تهاجم قرار گیرند. تولید سلول‌های جنسی که از نظر عملکردی و کیفیت آسیب دیده هستند می‌تواند منجر به بروز ناهنجاری‌های مادرزادی مرگ جنین شده یا زمینه‌ای برای بروز سرطان باشد(۱) آسیب‌پذیری در عملکرد و مورفولوژی طبیعی اسپرم و هم‌چنین بروز آسیب در روند اسپرماتوژنز از شایع‌ترین علل ناباروری مردان به شمار می‌رود که از جمله عوامل موثر در این امر استرس اکسیداتیو حاصل از رادیکال‌های گونه های واکنش گر اکسیژنی (ROS) است که به عنوان عامل آسیب‌پذیری اسپرماتوزوئید شناخته شده است. در طول مراحل شیمی درمانی، مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدان سلولی ناتوان می‌شوند و در نتیجه شرایط برای استرس اکسیداتیو فراهم می‌گردد. سیکلوفسفامید(CP) به عنوان یک عامل آلکیله‌کننده و سایتوتوکسیک به طور گسترده در درمان سرطان‌های مختلف و نیز به عنوان یک عامل سرکوب‌کننده ایمنی در پیوند ارگان‌ها به کار می‌رود(۲). به رغم کاربردهای وسیع کلینیکی، سیکلوفسفامید موجب بروز اثرات جانبی زیادی از جمله سمیت تولید مثلی در انسان‌ها و حیوانات آزمایشگاهی شده است(۳). مردانی که به مدت ۴ ماه یا بیشتر تحت درمان با سیکلوفسفامید قرار گرفته‌اند وضعیت‌های متغیری از الیگواسپرمی یا آزواسپرمی را تجربه کرده‌اند(۴). 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، کاهش سنتز DNA در سلول‌های اسپرماتوگونی و کاهش سنتز پروتئین در سلول‌های اسپرماتید می‌شود(۵). 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 در بافت‌ها را بر هم زده و ازاین رو باعث ایجاد اختلالات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی ناشی از استرس اکسیداتیو شود(۶). با توجه به شواهد موجود، تجویز برخی آنتی‌اکسیدانت‌ها در طول شیمی درمانی به منظور سم‌زدایی بافت‌ها ضروری به نظر می‌رسد و منطقی است که کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز سیکلوفسفامید به وسیله یک آنتی‌اکسیدانت قوی و مطمئن می‌تواند به کمتر شدن سمیت تولید مثلی ناشی از آن منجر شود. ایمیدین دارویی است که به عنوان یک روش جدید و یک آنتی‌اکسیدانت برای مراقبت از پوست مورد استفاده قرار می‌گیرد. این دارو به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت 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 به سزایی دارد. این قرص از سال ۱۹۹۵ در کشورهای اروپایی مورد استفاده قرار گرفته است(۷). ترکیبات دارو شامل کمپلکس دریایی بیومارین است که از ترکیبات اصلی آن بوده و غنی از پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدهای مشابه با ساختار پوست می‌باشدکه برای حفظ ساختار طبیعی آن ضروری است. این ماده شامل مقادیر زیادی از اسیدهای آمینه و پپتیدها می‌باشد که به طور مستقیم در سنتز کلاژن و الاستین دخالت دارند. ماده موثر دیگری که در این قرص وجود دارد لیکوفنس جی – اس است که دارای دو نوع آنتی‌اکسیدانت بسیار قوی می‌باشد و از عصاره گوجه‌فرنگی و عصاره هسته انگور به دست می‌آید که عصاره انگور خاصیت آنتی‌اکسیدانتی صد برابر قوی‌تر از ویتامین E دارد و نقش مهمی در دفاع از محیط‌های چربی‌دوست نظیر غشای سلولی ایفاء می‌کند. از سوی دیگر عصاره هسته انگور ۵۰ برابر قوی‌تر از ویتامین C می‌باشد. این ماده نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانتی در محیط‌های آب‌دوست نظیر پلاسمای سلولی دارد و در محیط‌هایی که غنی از پروتئین پلی‌ساکارید هستند تجمع می‌یابد(۸). مطالعه حاضر با توجه به این یافته‌ها طرح‌ریزی شد تا مشخص شود آیا تجویز ایمیدین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی

می‌تواند از بروز سمیت تولید مثلی و استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز سیکلوفسفامید در موش‌های سوری نر جلوگیری کند یا خیر.

مواد و روش‌ها

برای انجام این مطالعه تجربی، ۶۰ قطعه موش سوری نر بالغ بارور (۱۰-۸ هفته) نژاد NMRI با متوسط وزن ۲۰ گرم که باروری آنها قبلا از طریق آمیزش با موش‌های ماده آزمایش شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. متعاقب دو هفته سازگاری با شرایط محیط در پنج گروه تیمار، یک گروه کنترل تقسیم‌بندی و در شرایط استاندارد و مساوی نگهداری شد وآب و غذا به صورت آزاد در اختیار آن قرارگرفت. در گروه کنترل، موش‌ها سرم فیزیولوژی دریافت کردند. پنج گروه دیگر گروه‌های آزمایش به این شرح بودند: گروه اول موش‌هایی که روزی یک بار به آنها سیکلوفسفامید با دوز ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم با حجم ۰/۲ سی سی تجویز شد، گروه دوم موش‌های دریافت کننده ایمیدین با دوز ۱۱۱ میکروگرم بر کیلوگرم با حجم ۰/۲ سی‌سی به صورت روزانه بودند، گروه سوم، روزی دو دوز ایمیدین به فاصله ۱۲ ساعت دریافت کردند، گروه چهارم، روزی یک بار ایمیدین و ۴ ساعت بعد از آن سیکلوفسفامید دریافت کردند و گروه آخر نیز روزی دو دوز ایمیدین و ۴ ساعت بعد از دریافت دوز اول ایمیدین، سیکلوفسفامید دریافت کردند. تمامی تجویز داروها به گروه‌ها به صورت خوراکی از طریق سوند گاواژ و به مدت ۳۵ روز بوده است. پس از طی دوره درمان، از موش‌ها نمونه‌گیری شد. برای این منظور بعد از بی‌هوشی و جا به جایی گردن، دم اپیدیدیم‌ها پس از جدا کردن بافت‌های هم‌بندی اطراف، جدا شده و متعاقباً درون محیط کشت HTF حاوی ۴ میلی‌گرم بر میلی لیتر آلبومین سرم گاوی (BSA) (شرکت سیگما آمریکا) که از قبل در شرایط ۵ درصد دی اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به تعادل رسیده بود، قرار داده شدند. دم اپیدیدیم‌ها به قطعات مختلف تقسیم شدند و به مدت ۲۰ دقیقه درون محیط کشت باقی ماندند. قابل ذکر است که در این مدت پلیت‌های استریل محتوی نمونه اسپرم داخل انکوباتور CO_2 قرار گرفته بودند. بعد از ۳۰ دقیقه قطعات بافتی از محیط خارج شدند(۹). برای ارزیابی تحرک اسپرم، نمونه اسپرم‌ها مطابق با روش بالا استحصال شدند و متعاقب رقیق سازی اسپرم‌ها برای هر موش در هر گروه، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم جهت ارزیابی درصد تحرک اسپرم با استفاده از لام نئوبار مورد استفاده قرارگرفت. برای ارزیابی تعداد اسپرم به ازای دم اپیدیدیم از لام نئوبار استفاده شد که برای هر موش در هر گروه ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور رقت ۱ به ۵۰ از سوسپانسیون مذکور تهیه شد؛ به این صورت که ۹۸۰ میکرولیتر آب مقطر داخل یک میکروتیوب ۱ میلی‌لیتری ریخته شد و سپس ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم به آن اضافه گشت، بعد ۱۰ میکرولیتر از محلول مورد نظر برداشته و بر روی لام نئوبار، که لامل سنگی از قبل برروی آن قرار داده شده بود، ریخته شد و شمارش تعداد اسپرم‌ها به این روش صورت گرفت(۱۰). برای ارزیابی قدرت زیست‌پذیری و تعیین درصد اسپرم‌های زنده از اسپرم‌های مرده از روش رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین استفاده شد. اصول این کار بر این نکته استوار است که در اثر آسیب به غشاء پلاسمایی، اسپرم‌ها در برابر رنگ مذکور نفوذپذیر می‌شوند. بنابر این آن دسته از اسپرم‌هایی که سر آنها رنگ گرفته بود به عنوان اسپرم‌های مرده شناخته شدند و نتایج در قالب درصد بیان شد. برای ارزیابی دقیق‌تر مورفولوژیک و هم‌چنین تشخیص بقایای سیتوپلاسمی که نشان از عدم بلوغ مرفولوژیک اسپرم‌ها در طی گذر آنها از اپیدیدیم است، رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین مورد استفاده قرار گرفت.آن دسته از اسپرم‌هایی که محتوی بقایای سیتوپلاسمی بودند به عنوان اسپرم‌های غیرطبیعی (از لحاظ مرفولوژیک) در نظر گرفته شدند. اسپرم‌های غیرطبیعی در قالب ۳ دسته از اسپرم‌هایی که اختلال در سر،گردن و دم یا اختلال هم‌زمان در سر و دم را نشان می‌دادند و یا حاوی بقایای سیتوپلاسمی بودند ارزیابی شدند(۱۱). از سوی دیگر برای ارزیابی بلوغ هسته اسپرم از

رنگ‌آمیزی آنیلین بلو استفاده شد. این تحلیل براین نکته استوار است که طی مرحله اسپرمیوژنز، پروتامین به جای هیستون در کروماتین هسته قرار می‌گیرد که این جایگزینی در تراکم و پایداری اسپرم بسیار با اهمیت است. در این رنگ‌آمیزی، اسپرم‌های نابالغ به دلیل هیستون زیاد به رنگ آبی‌تیره درآمده و اسپرم‌های بالغ از رنگ‌پذیری کمتری برخوردار هستند. هم‌چنین برای ارزیابی هرگونه شکستگی در دو رشته DNA ی اسپرم، رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج در نظرگرفته شد. این رنگ‌آمیزی برای شناسایی آن دسته از اسپرم‌هایی که DNAی آنها دچار شکست شده است، مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ به این صورت که اسپرم‌های سالم به رنگ سبز و اسپرم‌هایی که DNA ی آنها دچار شکست شده باشد متعاقب رنگ‌آمیزی، DNA به رنگ زرد تا قرمز فلورسنت دیده می‌شود. در نتیجه آن دسته از اسپرم‌هایی که این حالت را نشان می‌دادند به عنوان اسپرم‌هایی که DNA آسیب دیده دارند در نظر گرفته شدند و نتایج حاصل از این بررسی در قالب درصد بیان گردید(۱۲).

تمامی داده‌های به دست آمده در این مطالعه و مقایسه خصوصیات اسپرم بین گروه‌های آزمایشی به وسیله نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ و روش آماری آنووا یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی باسطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند و نتایج به صورت جدول بیان شد.

یافته ها

مقایسه آماری نتایج حاصل از تراکم(تعداد) اسپرم به ازای دم اپیدیدیم در جدول ۱ نشان داد که تجویز سیکلوفسفامید در مقایسه با گروه کنترل سبب کاهش معنی‌دار تعداد اسپرم‌ها شده است و تجویز ایمیدین همراه با سیکلوفسفامید سبب افزایش تعداد اسپرم در مقایسه با گروه سیکلوفسفامید شده است($p<۰/۰۵$). درصد اسپرم‌های زنده که بر طبق تصویر ۱ در رنگ آمیزی ائوزین- نگروزین مشخص شده بودند، در گروه‌های آزمایشی به دست آمد (جدول۱). در گروه سیکلوفسفامید کاهش تعداد اسپرم‌های زنده نسبت به گروه کنترل به طور چشمگیر مشهود بود. در دو گروه دریافت کننده ایمیدین+سیکلوفسفامید بهبود نسبی در روند ازبین رفتن اسپرم‌ها نسبت به گروه سیکلوفسفامید به وجود آمده بود($p<۰/۰۵$). طبق جدول ۱، درصد اسپرم‌های متحرک در شش گروه آزمایشی بررسی شد که درگروه سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل کاهش و در دو گروه دریافت کننده ترکیب سیکلوفسفامید+ ایمیدین نسبت به گروه سیکلوفسفامید افزایش معنی‌داری از نظر آماری مشاهده شد($p<۰/۰۵$). در جدول ۱ اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی در گروه‌های آزمایشی شمرده و به صورت درصد بیان شدند، اختلاف معنی‌داری بین گروه سیکلوفسفامید با گروه کنترل و دو گروه ایمیدین + سیکلوفسفامید با گروه سیکلوفسفامید مشاهده گردید($p<۰/۰۵$). بر طبق روش ارزیابی با آکریدین اورنج، تعداد اسپرم‌های دارای کروماتین آسیب دیده با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت در شش گروه محاسبه شد و درصد آنها به دست آمد. در جدول ۱ بیان شده است که اسپرم‌هایی با هسته سبز رنگ طبیعی و هسته زرد تا قرمز، بسته به میزان آسیب کروماتین، به عنوان اسپرم‌هایی با DNA آسیب دیده در نظر گرفته می‌شوند، اختلاف بین میانگین درصد اسپرم‌هایی با DNA آسیب دیده در گروه سیکلوفسفامید با گروه کنترل معنی‌دار بود، دریافت سیکلوفسفامید به همراه ایمیدین باعث کاهش این اختلاف نسبت به گروه سیکلوفسامید گردیده است($p<۰/۰۵$). تعداد اسپرم‌هایی با کروماتین نابالغ در شش گروه آزمایشی در جدول ۱ محاسبه و درصد آنها به دست آمد، وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل با سیکلو فسفامید و دو گروه سیکلوفسفامید + ایمیدین با سیکلوفسفامید قابل مشاهده است.

جدول ۱. مقایسه کیفیت اسپرم در گروه های مختلف آزمایشی

گروه	پارامتر	تعداد اسپرم ها (میلی لیتر/$۱۰^۶$)	قابلیت زنده ماندن اسپرم (درصد اسپرم های زنده)	درصد اسپرم های متحرک	(مورفولوژی) (درصد)	درصد DNA تک رشته ای و شکسته	کروماتین نابالغ (درصد)
کنترل		۲۸/۷۵±۶/۶۱	۶۹/۲۵±۱/۴۳	۶۴/۰۰±۲/۴۵	۸۶/۲۵±۱/۴۹	۲/۲۵±۰/۶۲	۱/۷۵±۰/۴۷
سیکلوفسفامید		۹/۳۷±۸/۲۶a	۳۸/۰۰±۲/۶۷a	۳۱/۰۰±۳/۷۹a	۵۶/۵۰±۲/۳۲a	۲۷/۰۰±۱/۹۵a	۲۶/۵۰±۱/۹۳a
ایمیدین تک دوز		۳۳/۱۲±۱۷/۴۸b	۷۱/۷۵±۱/۷۹b	۵۸/۰۰±۱/۴۹b	۸۷/۰۰±۱/۴۷b	۰/۷۵±۰/۴۷b	۱/۰۰±۰/۴b
ایمیدین دودوز		۲۸/۵۰±۹/۳۵b-c	۷۳/۰۰±۱/۵۸b	۵۷/۰۰±۲/۷۸b	۸۶/۰۰±۱/۴۷b	۱/۲۵±۰/۷۵b	۰/۵۰±۰/۲۸b
ایمیدین تک دوز+ سیکلوفسفامید		a-b-c- d ۲۱/۳۷±۸/۹۸	a-b-c-d ۵۱/۰۰±۲/۸۳	a-b ۴۸/۰۰± ۱/۲۹	۵a-b-c-d ۷۰/۰۰±۱/۸	a-b-c- ۱۱/۰۰±۱/۴۷d	a-b-c- ۹/۵۰±۱/۰۴d
ایمیدین دو دوز+ سیکلوفسفامید		b-c ۲۴/۵۰±۷/۰۷	a-b-c-d ۵۵/۰۰±۱/۹۳	۵۱/۰۰±۴/۴۵ b	a-b-c-d ۶۹/۰۰±۲/۰۱	a-b-c-d-e ۹/۰۰±۱/۰۸	a-b-c-d ۹/۲۵±۰/۷۵

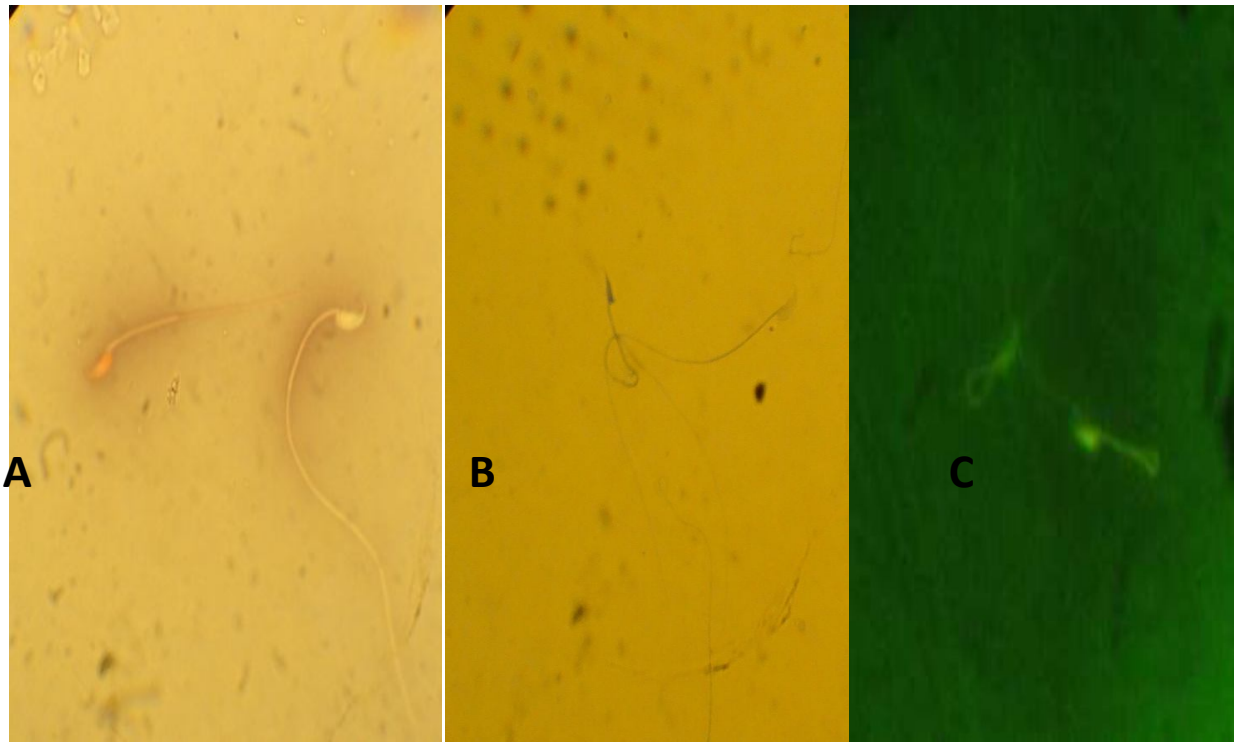
a : بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار، در مقایسه گروه کنترل با سایر گروه ها ($p<۰/۰۵$).

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. ($p<۰/۰۵$).

d: بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار، در مقایسه گروه ایمیدین دودوز با سایر گروه‌ها. ($p<۰/۰۵$).

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



تصویر ۱. رنگ آمیزی اسپرم(ائوزین نگروزین، آکریدین اورنج، آنیلین بلو)

تصویرA نشان دهنده‌ی اسپرم زنده با سر روشن در سمت راست و اسپرم مرده با سر رنگ گرفته متمایل به نارنجی در سمت چپ تصویر در رنگ‌آمیزی ائوزین نگروزین(بزرگنمایی×۱۰۰۰). تصویرB اسپرم بالغ با سر و هسته‌ی آبی روشن در سمت راست و اسپرم نابالغ با سر و هسته‌ای به رنگ آبی تیره درسمت چپ در رنگ-آمیزی آنیلین‌بلو با بزرگنمایی×۱۰۰۰ مشخص است. تصویرC اسپرم با DNAی سالم به رنگ سبز(سر) در سمت چپ و اسپرم با DNAی آسیب‌دیده با هسته‌ی زرد رنگ در سمت راست تصویر در رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج قابل مشاهده است.

بحث

بسیاری از داروهایی که به منظور شیمی درمانی در سرطان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند به خصوص سیکلوفسفامید عوارض جانبی سمی در سیستم‌های متعدد بدن بر جای می‌گذارند که دستگاه تولید مثل نر یکی از آنها است(۳). 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 مهم‌ترین عاملی است که به شدت کاربردهای درمانی این دارو در مهار بدخیمی‌ها و سرکوب سیستم ایمنی را تحت تأثیر قرار داده است(۱۳). بررسی‌های بی‌شمار صورت گرفته، مسمومیت ناشی از داروی سیکلوفسفامید در دستگاه تولید مثل نر را به مکانیسم اکسیدانتی نسبت می‌دهند که به واسطه غیرفعال سازی آنزیم‌های میکروزومی از طریق این دارو و متابولیت حاصل از آن یعنی آکرولئین و در نتیجه افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و پراکسیداسیون لیپیدی روی می‌دهد(۱۴). بررسی‌های به عمل آمده در این مطالعه نشان داد که تجویز داروی سیکلوفسفامید کاهش معنی‌داری را در تعداد اسپرم به ازای دم اپیدیدیم و میزان تحرک اسپرم‌ها و در عین حال افزایش معنی‌داری را در میزان اسپرم‌های مرده و غیر طبیعی در پی‌دارد که این یافته‌ها نیز گزارشات قبلی در این زمینه را تایید می‌کنند. کاهش تعداد اسپرم‌ها متعاقب تجویز داروی سیکلوفسفامید طور آشکار موید کاهش سلول‌های اسپرماتوژنیک بوده و هجوم رادیکال‌های آزاد حاصل از متابولیسم داروی سیکلوفسفامید را خاطر نشان می‌سازد. کاهش تعداد اسپرم‌ها در موش‌های سوری نر درمان شده با سیکلوفسفامید می‌تواند پیامد تهی شدن لوله‌های منی‌ساز بیضه از سلول‌های زایا در نتیجه استرس اکسیداتیو باشد که بررسی‌های هیستولوژیک و مورفومتریک به عمل آمده در مطالعه حاضر نیز آن را تایید می‌کنند. کاهش محسوس میزان تحرک اسپرم‌ها نیز می‌تواند ناشی از اثرات سمی استرس اکسیداتیو ناشی از داروی سیکلوفسفامید بر روی تاژک اسپرم به واسطه کاهش سریع ATP داخل سلولی باشد. نتایج به دست آمده از تحقیقات متعدد تجربی و بالینی، کارآیی قابل توجه آنتی‌اکسیدانت‌ها را در حفاظت از دستگاه تولید مثل در برابر اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن و دیگر رادیکال‌های آزاد تولید شده متعاقب تجویز داروی سیکلوفسفامید مورد تایید قرار می‌دهند. این ترکیبات حتی در افزایش توانایی بیماران سرطانی جهت تحمل استرس‌های عمومی ناشی از شیمی درمانی و رادیوتراپی موفق بوده‌اند. مطالعه حاضر نیز نشان داد که داروی ایمیدین به دلیل دارا بودن مکانیسمی مشابه آنتی‌اکسیدانت‌هایی نظیر ویتامین C و E در مهار و یا کاهش آسیب‌های تولید مثلی ناشی از داروی سیکلوفسفامید در موش‌های سوری موثر است.

همان‌گونه که پیش‌تر نیز عنوان شد، به نظر می‌رسد فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانتی و مهار رادیکال‌های آزاد این دارو نتیجه عملکرد لیکوفنس جی-اس وکمپلکس بیومارین موجود در آن باشد که تاثیراتی چند برابر بیشتر از ویتامین C و E 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. با وجود آن که مطالعات زیادی روی این دارو صورت نگرفته و تنها اطلاعات محدودی در مورد اثرات این دارو بر روی پوست در دسترس می‌باشد، ولی می‌توان گفت این دارو به سبب دارا بودن ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانتی قابل ملاحظه در توقف روندپیری پوست، افزایش میزان رطوبت پوست، کاهش عروق سطحی ولک‌های ناشی از افزایش سن، جلوگیری از تخریب اجزای پوست و بهبود ساختار آن و از همه مهم‌تر خاصیت ضدسرطانی و مهاری در مقابل رادیکال‌های آزاد که در مطالعه فوق اطلاعات مفیدی راجع به آن به دست آمد، نقش به سزایی را ایفا می‌کند.

نتیجه‌گیری

در نهایت، با جمع‌بندی یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان چنین نتیجه گرفت که داروی سیکلوفسفامید از طریق بر هم‌زدن تعادل اکسیداسیون – احیاء موجب بروز استرس‌های اکسیداتیو و نیتروزاتیو می‌گردد که این استرس‌های بیوشیمیایی توکسیک به واسطه ایجاد اختلال در

دسترسی به آندروژن‌ها ومتابولیسم انرژی، تحریک آپوپتوز و نیز پی‌ریزی واکنش‌های التهابی و توسعه آنها، موجب مسمومیت تولید مثلی دستگاه تولید مثل نر می‌گردد، حال آن که این مطالعه برای اولین بار نشان داد که داروی ایمیدین به سبب دارا بودن ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانتی 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 هم‌زمان در روند شیمی درمانی مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از زحمات و راهنمایی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه در اجرای این مطالعه تشکر و قددانی می نمایند.

منابع

1. Robaire B, Hales BF. Mechanisms of action of cyclophosphamide as a male-mediated developmental toxicant. Advances in Male Mediated Developmental Toxicity: Springer; 2003. p. 169-80.
2. Dollery C. Cyclophosphamide. Therapeutic drugs Edinburgh: Churchill Livingstone. 1999: 349-53.
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. Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis. 1995;330(1):115-81.
4. Qureshi M, Pennington J, Goldsmith H, Cox P. Cyclophosphamide therapy and sterility. The Lancet. 1972;300(7790):1290-1.
5. Meistrichml ML, Parchuri N, Wilson G, Kurdglu B, Kangasniemi M. Hormonal protection from cyclophosphamide-induced inactivation of rat stem spermatogonia. Journal of andrology. 1995;16(4):334-41.
6. Ghosh D, Das U, Ghosh S, Mallick M, Debnath J. Testicular gametogenic and steroidogenic activities in cyclophosphamide treated rat: a correlative study with testicular oxidative stress. Drug and chemical toxicology. 2002;25(3):281-92.
7. Kieffer M, Esfen J. Imedeen in the treatment of photoaged skin: an efficacy and safety trial over 12 months. J Eu Acad Dermatol Venereol 11. 1998; 129-136
8. Lassus A, et al. Imedeen for the treatment of degeneratedskin in females. JInt Med Res. 1991; 19: 145-157.
9. Hedrich H. The laboratory mouse Handbook of experimental animals. 2ed Academic Press, New York.2006.p.439-46.
10. Wyrobek AJ, Gordon LA, Burkhart JG, Francis MW, Kapp RW, Letz G, et al. An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology. 1983; 115(1):1-72.
11. Rezvanfar M, Sadrkhanlou R, 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. Human & experimental toxicology. 2008; 27(12):901-10.
12. Sadeghi MR, Hodjat M, Lakpour N, Arefi S, Amirjannati N, Modarresi T, et al. Effects of sperm chromatin integrity on fertilization rate and embryo quality following intracytoplasmic sperm injection. Avicenna journal of medical biotechnology. 2009;1(3):173-4.
13. Lear L, Nation R, Stupans I. Effects of cyclophosphamide and adriamycin on rat hepatic microsomal glucuronidation and lipid peroxidation. Biochemical pharmacology. 1992; 44(4):747-53.
14. Sawada T, Tamada H, Mori J. Secretion of testosterone and epidermal growth factor in mice with oligozoospermia caused by doxorubicin hydrochloride. Andrologia. 1994; 26(3):151-3.