

## بررسی اثر جانبی بوسولفان در بافت بیضه و اسپرم اپیدیدیمی موش بالغ بدنبال تیمار با دوز درمانگاهی

پروا نسیمی<sup>۱</sup> Ph.D.، اکبر وحدتی<sup>۱\*</sup> Ph.D.، محمد رضا تاینده<sup>۳</sup> Ph.D.، سعید خاتم ساز<sup>۲</sup> Ph.D.

- ۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، فارس، گروه زیست شناسی، فارس، ایران
- ۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، گروه زیست شناسی، شیراز، ایران
- ۳- دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، گروه بیوشیمی و سلولی مولکولی، اهواز، ایران
- ۴- دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، گروه زیست شناسی، کازرون، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: avahdatim@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۷/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱/۱۹

### چکیده

**هدف:** هدف از این تحقیق بررسی آثار جانبی دوز درمانگاهی بوسولفان بر بافت بیضه و اسپرم اپیدیدیمی موش نر بالغ است.

**مواد و روش‌ها:** موش‌های نر بالغ نژاد NMRI (۲۵ تا ۳۵ گرم) به دو گروه شانزده تایی تقسیم شدند. کنترل و گروه تیمار با بوسولفان که به ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl Sulfoxide) و ۳/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان به مدت چهار روز دریافت کردند. حیوانات ۳۵ روز بعد از آغاز درمان کشته شدند. تغییرات بافتی در لوله سمی نیفر، پارامترهای کیفی اسپرم (تعداد و مورفولوژی)، قابلیت حیات و شکست کروموزومی اسپرم به ترتیب به وسیله میکروسکوپ نوری، CASA (Computer-aided Sperm Analyzer)، سنجش MTT (3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5 Diphenyltetrazolium Bromide) و سنجش تانل بررسی شدند.

**نتایج:** بوسولفان به طور معنی‌داری منجر به کاهش پارامترهای اسپرم (تعداد و مورفولوژی طبیعی) و افزایش تخریب دیواره لوله سمی نیفر شد. ناهنجاری‌های سر، قطعه میانی و دم در اسپرم گروه درمان در مقایسه با کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته بود. از سوی دیگر، سطوح پایین‌تر MTT در گروه درمان در مقایسه با کنترل معنی‌دار بود. افزایش تعداد اسپرم‌های تانل مثبت در گروه درمان نشان دهنده افزایش شکست کروموزومی به دنبال درمان با بوسولفان بود.

**نتیجه گیری:** نتایج نشان داد که دوزهای درمانگاهی بوسولفان آثار ژنوتوکسیک، پراپوپتوتیک و سیتوتوکسیک بر روند اسپرماتوژنز می‌گذارد. علاوه بر آن، بوسولفان سیتوتوکسیستی را در بافت بیضه افزایش می‌دهد.

**واژگان کلیدی:** آپوپتوزیس، بوسولفان، اسپرم اپیدیدیمی، حیات اسپرمی، بیضه

## مقدمه

مثلی، به‌ویژه در جنس نر بدست آمده است. اما عمدتاً در مطالعات اخیر از دوزهای بالا و سمی بوسولفان استفاده شده است (۶، ۱۱ و ۱۳). این در شرایطی است که دوزهای پایین و با سمیت کمتر بوسولفان و سایر داروهای شیمی درمانی طی درمان سرطان مد نظر قرار می‌گیرند. اما کمبود مطالعه‌ای دقیق در تعیین آثار جانبی دوزهای پایین و درمانگاهی بوسولفان در بافت سالم فرد تحت شیمی درمانی و به‌ویژه در سیستم تولید مثل آشکار است. بنابراین، هدف از این تحقیق، مطالعه آثار سمی دوز درمانگاهی (۳/۲ میلی گرم بر کیلوگرم) بوسولفان بر بافت بیضه و اسپرم اپیدیدیمی موش بالغ نژاد NMRI بوده است.

## مواد و روش‌ها

**نگهداری حیوانات:** برای انجام این تحقیق، موش‌های نر بالغ نژاد NMRI با میانگین وزنی  $30 \pm 5$  گرم (۸ هفته‌ای) از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز خریداری شدند. حیوانات در شرایط استاندارد (دمای  $21 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) با دسترسی به آب و غذای کافی و براساس راهنمای مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی (National Institutes of Health publication No. 86-23 نگه‌داری شدند).

**تیمار حیوانات:** ۳۲ سر موش نر بالغ نژاد NMRI به دو گروه ۱۶ تایی تقسیم شدند. جهت تیمار موش‌ها، بوسولفان (Sigma, St. Louis, MO) در DMSO (Dimethyl Sulfoxide) ۲ درصد و آب مقطر استریل با نسبت ۱:۱ در دمای اتاق حل گردید. گروه کنترل به مدت ۴ روز به‌صورت زیر جلدی ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (Sigma, St. Louis, MO) در روز و گروه تیمار با بوسولفان به مدت ۴ روز ۳/۲ میلی گرم بر کیلوگرم بوسولفان به‌صورت درون صفاقی دریافت کردند.

**تشریح حیوانات و استخراج نمونه:** حیوانات با استفاده از تزریق داخل صفاقی ماده‌ی بی‌هوش‌کننده‌ی کتامین هیدروکلراید (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گزیزلین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شدند. سپس در شرایط استریل تشریح و پس از باز نمودن ناحیه شکم، بیضه و اپی‌دیدیم چپ خارج گردید. اپی‌دیدیم به لوله‌ی اپندورف حاوی ۱ میلی‌لیتر سالین فسفات PBS (Phosphate Buffer Saline, pH=7.4) منتقل و به قطعات کوچکتر تقسیم شد. لوله‌های حاوی نمونه برای مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور  $CO_2$  دار با دمای ۳۷ درجه

بوسولفان یکی از رایج‌ترین داروهای شیمی درمانی است که قبل از پیوند مغز استخوان در کودکان و بالغین مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱ و ۲). علاوه بر آن، این دارو در درمان لوسمی میلوژنیک مزمن و سرطان تخمدان نیز به‌طور وسیع کاربرد دارد (۳ و ۴). این در حالی است که بوسولفان به سلول‌های سالم فرد تحت شیمی درمانی آسیب می‌زند. آسیب داروهای شیمی درمانی مانند بوسولفان به DNA سلول‌ها منجر به القای پیری (۵) و در شرایطی آپوپتوزیس (۶) می‌گردد. این دارو توانایی القای آپوپتوزیس را در سلول‌های زایای بیضه دارد (۳ و ۴).

پیر شدن سلولی در نتیجه مصرف بوسولفان در سلول‌های فیبروبلاست WI39 طی سیگنال خارج سلولی تنظیم‌کننده‌ی کیناز (Erk) و آبشار p38 MAPK (p38 Mitogen-activated protein kinase) رخ می‌دهد. علاوه بر آن، دو مسیر Erk و p38 MAPK از جمله مسیرهای القای آپوپتوزیس می‌باشند. القای پیری وابسته به بوسولفان در سلول‌های WI139 با حذف سریع گلوکوتایون داخل سلولی و افزایش پیوسته در تولید ROS (Reactive Oxygen Species) همراه است، که ناشی از فعالیت مسیر Erk و p38MAPK می‌باشند (۷).

از سوی دیگر، این دارو واجد اثرات جانبی متعددی بر گندهای هر دو جنس نر و ماده (۱ و ۸)، اسپرماتوژنز و تولید اسپرم طبیعی (۹ و ۱۰) است. در واقع بوسولفان به‌دلیل خاصیت آلکیل‌کنندگی، دارای تاثیر سوء بر DNA سلول‌هایی است که دارای قدرت تقسیم بیشتری هستند. به همین دلیل یکی از بیشترین اثرات خود را بروی اسپرماتوگونی‌های بیضه می‌گذارد. با وجود آن، تمام اسپرماتوگونی‌ها به‌دنبال مصرف بوسولفان از بین نمی‌روند (۱۱).

مطالعات اخیر نیز مؤید القای آواسپرمی در موش به‌دنبال تیمار با بوسولفان است (۱۲). تیمار با تک دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان، آپوپتوزیس را در سلول‌های زایای نر به‌خصوص در اسپرماتوگونی‌ها و اسپرماتوسیت‌های اولیه القا می‌کند (۱۱). از سوی دیگر تزریق منفرد ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان منجر به حذف وسیع سلول‌های اسپرماتوژنیک در بافت بیضه موش نر و افزایش درصد اسپرم‌های واجد مورفولوژی غیر طبیعی می‌گردد (۱۳). نتایج کاربردی فراوانی از مطالعات آثار جانبی شیمی درمانی بر سیستم تولید

**بررسی قابلیت حیات اسپرم، سنجش MTT** پودر زرد رنگ MTT (Sigma, USA) با نسبت ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر در محیط HAM'S F10 و HEPES (25mM) (4-(2- hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) pH آن به ۷/۴ رسید. سپس BSA با غلظت ۱۰ درصد به محلول MTT اضافه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد و در تاریکی حداکثر برای مدت زمان یک هفته نگه داری شد.

رسوب اسپرم به منظور ایجاد غلظت نهایی ۱/۵ تا ۲ میلیون اسپرم در ۵۰ میکرولیتر در PBS (pH 7.4) حل شد. ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپرمی به ۴۵۰ میکرولیتر MTT (که قبل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفته بود) مخلوط شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از گذشت ۲ ساعت نمونه‌ها از انکوباتور خارج و ۲۰۰ میکرولیتر DMSO جایگزین محلول MTT شد. سپس میزان جذب در طول موج تست ۵۷۰ نانومتر و طول موج رفرنس ۶۷۰ نانومتر قرائت گردید. جذب نوری نهایی براساس اختلاف جذب بین طول موج‌های رفرنس و تست محاسبه شد. نتایج به صورت درصد در مقایسه با کنترل بیان شد.

**ارزیابی شکست کروموزومی، سنجش تانل:** قطعه قطعه شدن DNA اسپرم توسط تکنیک تانل بررسی شد. این تکنیک توانایی شناسایی سلول‌های آپوپتوتیک را براساس نحوه‌ی قطعه قطعه شدن DNA آن‌ها در سوسپانسیون سلولی و بافتی دارد (۱۴ و ۱۵).

تکنیک تانل با استفاده از کیت سنجش تانل In Situ Cell (Roche Death Detection Kit Fluorescein Diagnostics, Germany) و براساس دستورالعمل آن انجام شد. رسوب اسپرم در PBS (pH 7.4) به منظور ایجاد غلظت نهایی ۲ تا ۳ میلیون سلول در ۲۰۰ میکرولیتر حل شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم در ۳۰۰ گرم به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر پارافرم آلدئید ۴ درصد (در PBS) برای ۱ ساعت در دمای اتاق معلق گردید و مدام نمونه تکان داده شد تا از چسبیدن اسپرم‌ها به هم جلوگیری شود. بعد از پایان تثبیت، نمونه ابتدا ۲ بار در ۱۰۰ میکرولیتر PBS شستشو شدند و سپس جهت افزایش نفوذپذیری در غشای سلولی به مدت ۲ دقیقه بروی یخ در محلول ۰/۱ درصد تریتون X-۱۰۰ در ۰/۱ درصد سدیم قرار گرفتند.

سانتی گراد قرار گرفت و سپس قطعات کوچک بافتی خارج شدند. نمونه‌های اسپرم ۲ بار در محلول سالین فسفات PBS (pH=7.4) شستشو داده و رسوب اسپرمی به منظور مطالعه آپوپتوزیس، قابلیت حیات و سنجش پارامترهای اسپرم به ترتیب توسط سنجش تانل (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay: TUNEL assay) MTT (3-4, 5-) Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5 Diphenyltetrazolium (Computer-Aided Sperm CASA و Bromide Analysis) بررسی شدند. بیضه‌های استخراج شده نیز در محلول بوئن جهت مطالعات مورفولوژیکی تثبیت شدند.

**مطالعه مورفولوژی دیواره لوله‌های سمی نیفر بیضه:** بیضه‌ها بعد از ۴۸ ساعت تثبیت در بوئن، در پارافین قالب گیری شدند. برش‌های ۵ میکرومتر تهیه و با هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) رنگ آمیزی گردید. سپس نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند (Olympus/3H light microscope, Japan).

لوله‌های سمی نیفر با بررسی ۱۵ میدان در ۵ برش بافتی از هر بیضه به منظور مطالعه اثر تخریبی بوسولفان مطالعه شد. شدت تخریب لوله‌های سمی نیفر توسط دو فاکتور: حذف دیواره لوله‌های سمی نیفر و حضور اسپرم در لوله‌های سمی نیفر تعیین شد. براین اساس، ۴ نوع لوله سمی نیفر در بافت بیضه مشخص شد که شامل: نوع اول) دیواره لوله‌های سمی نیفر طبیعی واجد اسپرم، نوع دوم) حذف دیواره لوله‌های سمی نیفر و وجود اسپرم، نوع سوم) حذف دیواره لوله‌های سمی نیفر و عدم حضور اسپرم، نوع چهارم) لوله‌های سمی نیفر خالی.

علاوه بر آن، قطر لوله‌های سمی نیفر توسط نرم افزار image analyzer Leica (DMLB) and Leica Qwin بررسی شد. سپس، قطر و شدت تخریب لوله‌های سمی نیفر بین ۲ گروه مورد مقایسه قرار گرفت.

**سنجش پارامترهای اسپرم:** پارامترهای مختلف شامل تعداد اسپرم، اسپرم با مورفولوژی طبیعی و اسپرم غیر طبیعی با استفاده از برنامه CASA که بروی میکروسکوپ فاز کنتراست (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) نصب شده بود مطالعه شدند. سپس پارامترهای مختلف بین گروه‌های کنترل و تیمار با بوسولفان شده مقایسه شد.

نمونه‌های مستقل برای مقایسه مقادیر مختلف بین گروه تیمار و کنترل استفاده شد. نتایج به صورت  $\text{mean} \pm \text{SD}$  با درجه معنی‌داری  $p < 0.05$  بیان شد.

### نتایج

#### مطالعه مورفولوژیک لوله‌های سمی نیفر

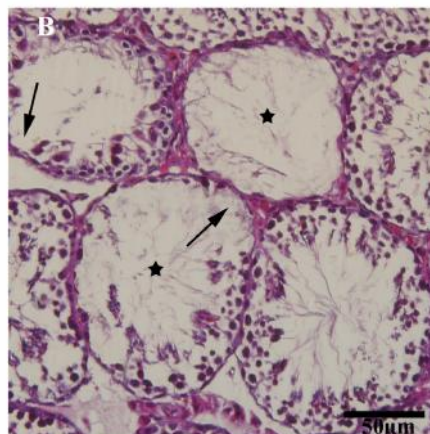
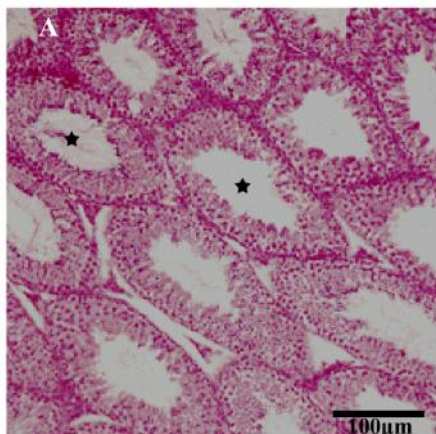
رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین جهت بررسی اثر مخرب بوسولفان بر دیواره لوله‌های سمی نیفر در گروه‌های کنترل و تیمار شده مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). سطح بالایی از تخریب دیواره لوله‌های سمی نیفر ۳۵ روز بعد از آغاز تیمار با ۳/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان (به‌طور روزانه به‌مدت ۴ روز) در گروه درمان مشاهده شد. از سوی دیگر، لوله‌های سمی نیفر در حیوانات کنترل طبیعی بودند.

محلول ۰/۱ درصد تریتون X-۱۰۰ در ۰/۱ درصد سدیم مورد استفاده برای افزایش نفوذپذیری به‌وسیله ۱ مرحله سانترفیوژ و ۳ بار شستشو در PBS حذف شد. سپس نمونه در ۵۰ مخلوط واکنش (۴۵ میکرولیتر محلول نشاندار نمودن و ۵ میکرولیتر TdT) معلق شد و به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در انتها نمونه ۲ بار در PBS شستشو داده شد.

۵۰ میکرولیتر از نمونه بروی لام منتقل و ۲۰۰ اسپرم در ۸ تا ۱۰ میدان دید تصادفی در زیر میکروسکوپ فلورسنس (Olympus, BX51, Japan) شمارش شد. سپس تعداد اسپرم‌های تائل مثبت در گروه‌های کنترل و تیمار با بوسولفان مقایسه شدند.

### آنالیز آماری

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) انجام شد آزمون- تی (T-test)

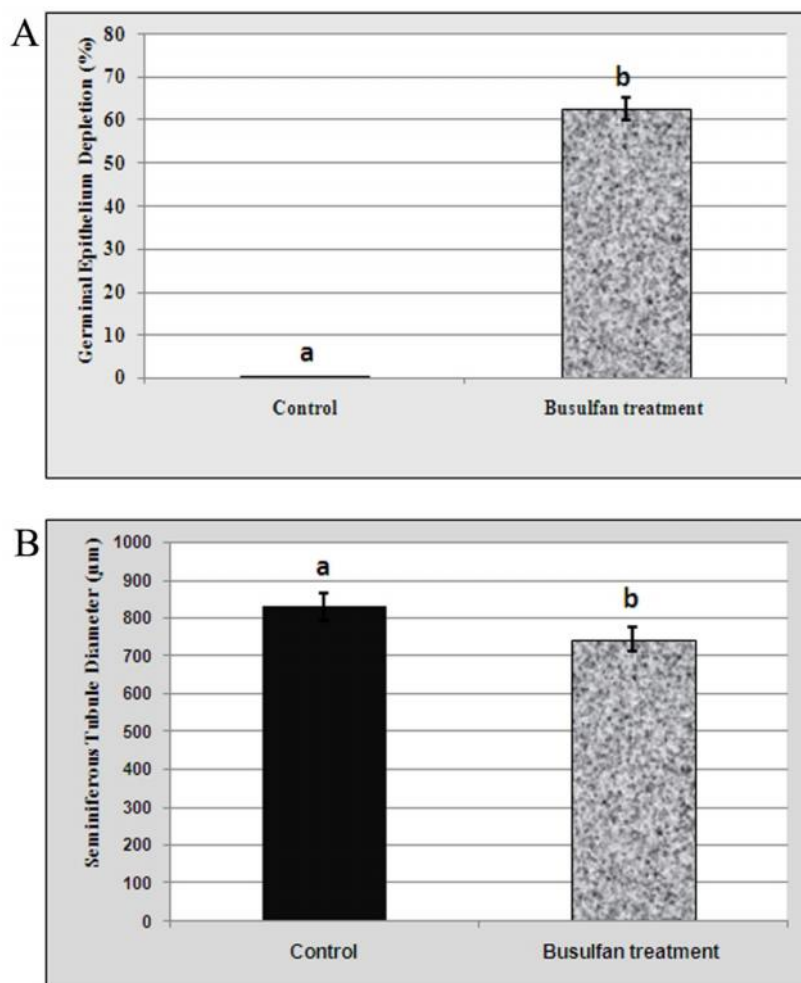


شکل ۱: تصاویر میکروسکوپ نوری لوله‌های سمی نیفر در موش‌های تیمار شده و کنترل. (A) لوله‌های سمی نیفر واجد دیواره‌ی طبیعی و نرمال در گروه کنترل. (B) حذف وسیع سلول‌های زایا در دیواره لوله سمی نیفر و افزایش فضای لومن در گروه تیمار با بوسولفان. (فلش: حذف سلول‌های دیواره لوله‌های سمی نیفر، ستاره: فضای لومن).

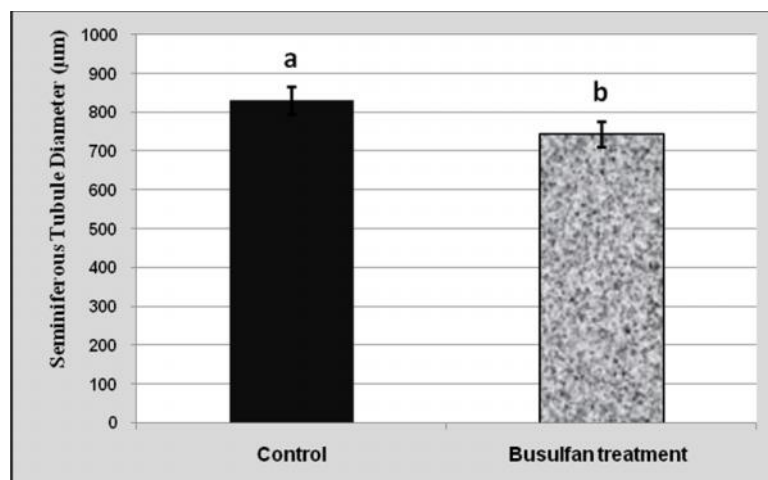
موش‌های تیمار شده با بوسولفان اختلاف معنی‌دار را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ( $p < 0.05$ ).

قطر لوله‌های سمی نیفر در گروه‌های کنترل و درمان به‌ترتیب حدود  $8/35 \pm 93/831$  و  $32 \pm 87/743$  میکرومتر بود (شکل ۳). بنابراین، قطر لوله‌های سمی نیفر در گروه درمان کاهش معنی‌دار را در مقایسه با کنترل نشان داد ( $p < 0.05$ ).

درصد لوله‌های که تخریب دیواره لوله‌های سمی نیفر را نشان داده و فاقد اسپرم بودند (لوله‌ی نوع ۳) و درصد لوله‌های خالی از سلول (لوله‌ی نوع ۴) در گروه تیمار با بوسولفان به‌ترتیب حدود  $2/52 \pm 67/62$  و  $1 \pm 16$  درصد بود (شکل ۲). درصد تخریب دیواره لوله‌های سمی نیفر و لوله‌های سمی نیفر فاقد سلول زایا در



شکل ۲: درصد تخریب دیواره لوله‌های سمی نیفر و لوله‌های سمی نیفر فاقد سلول زایا در موش‌های تیمار شده و کنترل. (A) درصد حذف دیواره لوله‌های سمی نیفر در گروه تیمار شده در مقایسه با کنترل نشان دهنده‌ی تغییرات معنی‌دار بود. (B) تعداد لوله‌های سمی نیفر خالی در گروه تیمار با بوسولفان بسیار زیاد و اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل را نشان داد. نتایج به صورت  $mean \pm SD$  با درجه معنی‌داری  $p < 0.05$  بیان شد (آزمون  $t$  مستقل).

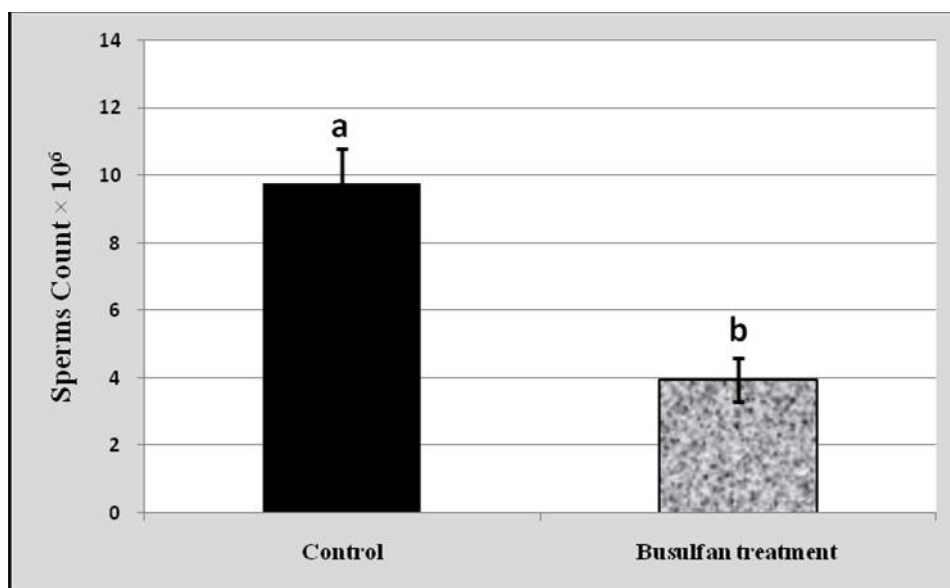


شکل ۳: بررسی قطر لوله‌های سمی نیفر در موش‌های تیمار شده و کنترل. قطر لوله‌های سمی نیفر در گروه تیمار با بوسولفان کاهش معنی‌داری را در مقایسه با کنترل نشان داد. نتایج به صورت  $mean \pm SD$  با درجه معنی‌داری  $p < 0.05$  بیان شد (آزمون  $t$  مستقل).

## بررسی پارامترهای اسپرم

درصد بالای اسپرم غیرطبیعی در گروه درمان در مقایسه با کنترل مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). (شکل ۵A و جدول ۱). علاوه بر آن، اسپرم‌های گروه تیمار شده با بوسولفان افزایش معنی‌داری را در ناهنجاری‌های سر، بخش میانی و دم در مقایسه با کنترل نشان دادند (شکل ۵B و جدول ۱).

نتایج نشان دهنده‌ی تغییرات در تعداد اسپرم و درصد اسپرم با مورفولوژی طبیعی در گروه تیمار در مقایسه با کنترل بود (جدول ۱). تعداد اسپرم (شکل ۴) و درصد اسپرم واجد مورفولوژی طبیعی (شکل ۵) کاهش معنی‌داری را در گروه درمان در مقایسه با کنترل نشان داد ( $p < 0.05$ ).



شکل ۴: بررسی تعداد اسپرم ( $10^6$  / میلی لیتر) در گروه‌های تیمار شده و کنترل. کاهش تعداد اسپرم در گروه تیمار با بوسولفان در مقایسه با کنترل معنی‌دار بود. نتایج به صورت  $mean \pm SD$  با درجه معنی‌داری  $p < 0.05$  بیان شد (آزمون  $t$  مستقل).

جدول ۱: نتایج تعداد اسپرم ( $10^6$  / میلی لیتر)، مورفولوژی طبیعی و اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی در موش‌های تیمار شده و کنترل. نتایج به صورت  $mean \pm SD$  با درجه معنی‌داری  $p < 0.05$  بیان شد (آزمون  $t$  مستقل).

Groups	Sperm Count ( $\times 10^6$ /ml)	Normal Morphology (%)	Head abnormality (%)	Neck abnormality (%)	Tail abnormality (%)
Control	9.78 ± 1.02 <sup>a</sup>	75.3 ± 4.7 <sup>a</sup>	8.3 ± 1.3 <sup>a</sup>	13.5 ± 2.9 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.9 <sup>a</sup>
Busulfan treated group	3.92 ± 0.66 <sup>b</sup>	38.5 ± 3.5 <sup>b</sup>	30.8 ± 5.1 <sup>b</sup>	23.1 ± 6.4 <sup>b</sup>	7.6 ± 2.2 <sup>b</sup>

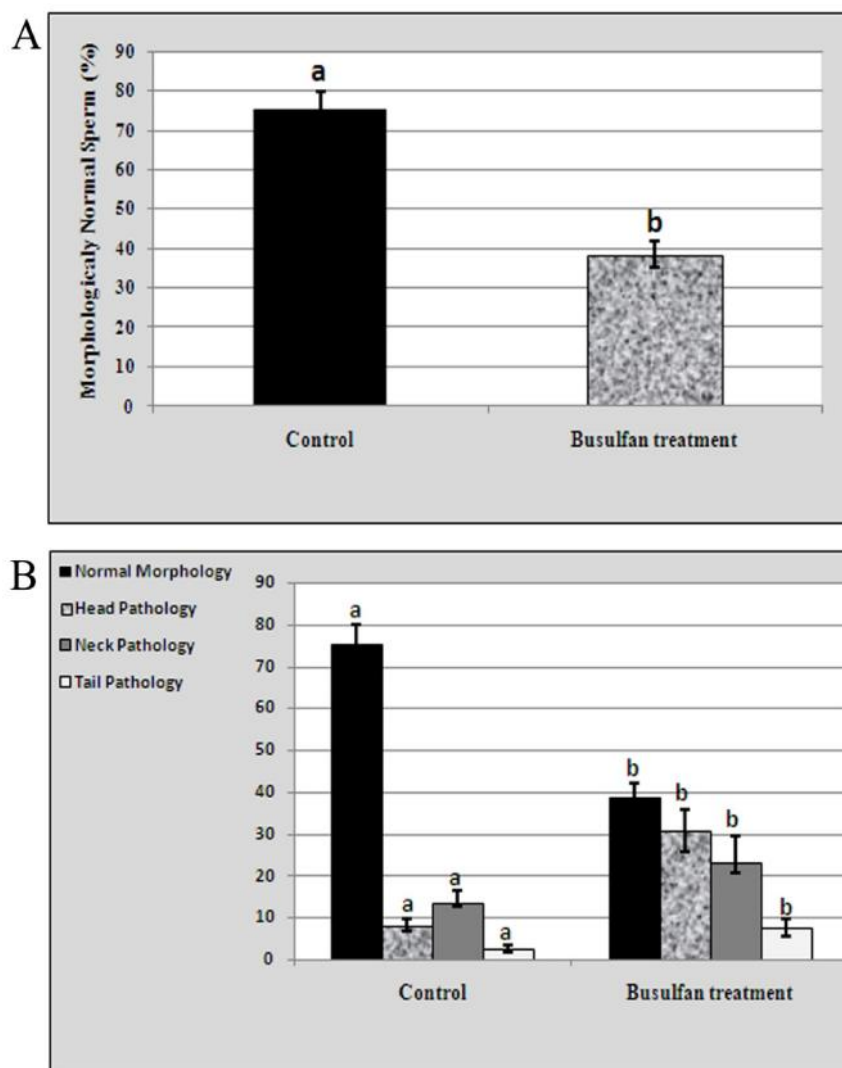
تانل مثبت در موش‌های گروه درمان افزایش معنی‌داری را در مقایسه با کنترل نشان داد ( $p < 0.05$ ).

## سنجش حیات اسپرم

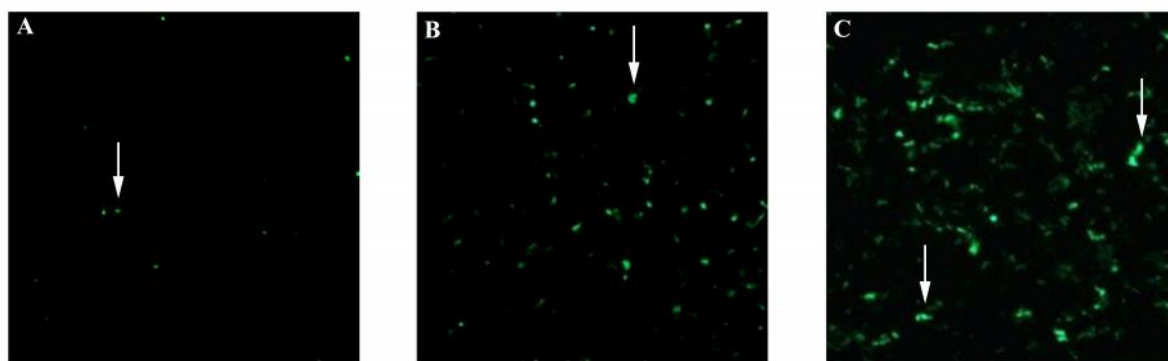
اختلاف معنی‌داری در قابلیت حیات اسپرم بین گروه‌های درمان با بوسولفان و کنترل مشاهده شد (شکل ۸). درصد حیات اسپرم در گروه‌های کنترل و تیمار شده با بوسولفان به ترتیب ۱۰۰ و ۷/۶۲ ± ۴۵/۲۶ درصد بود.

## ارزیابی شکست کروموزومی به روش TUNEL

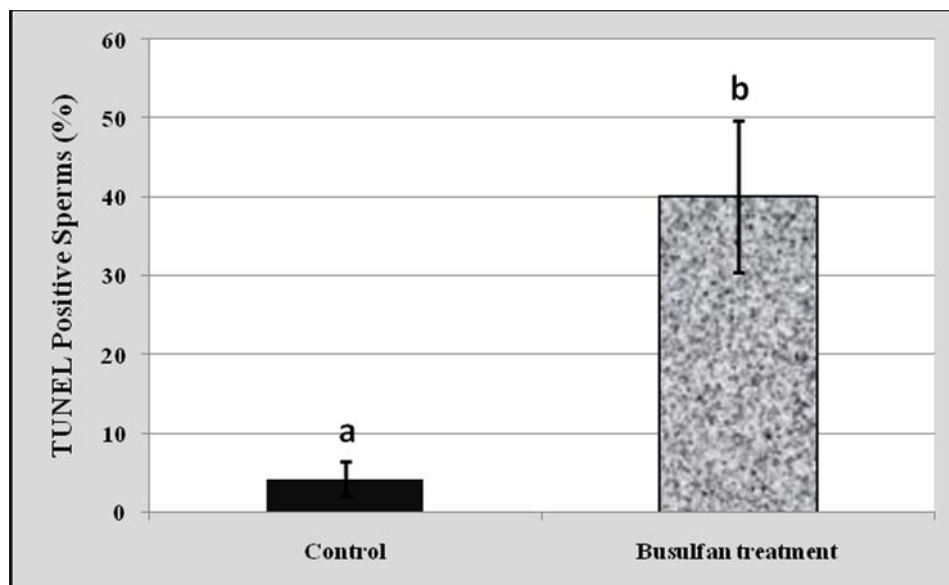
قطعه قطعه شدن DNA اسپرم‌های اپیدیدیمی توسط سنجش تانل مطالعه شد (شکل ۶). اختلاف معنی‌دار در درصد اسپرم‌های تانل مثبت (TUNEL positive) بین گروه‌های تیمار شده با بوسولفان و کنترل مشاهده شد (شکل ۷). درصد اسپرم‌های تانل مثبت در گروه‌های کنترل و تیمار با بوسولفان به ترتیب ۴/۲۳ ± ۲/۱۸ و ۴۰/۰۷ ± ۹/۶۵ بود. بنابراین، درصد اسپرم‌های



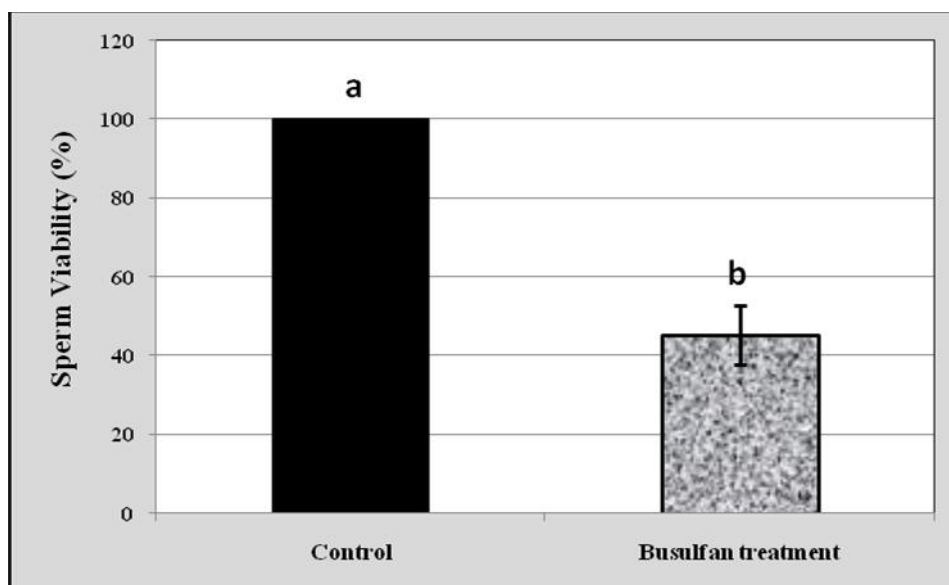
شکل ۵: مورفولوژی اسپرم اپیدیدیمی در موش‌های تیمار شده و کنترل. (A) کاهش معنی‌دار در تعداد اسپرم با مورفولوژی طبیعی در گروه تیمار با بوسولفان در مقایسه با کنترل دیده شد. (B) گروه تیمار با بوسولفان تعداد بیشتری اسپرم غیرطبیعی را در مقایسه با کنترل نشان داد. نتایج به صورت  $mean \pm SD$  با درجه معنی‌داری  $p < 0/05$  بیان شد (آزمون  $t$  مستقل).



شکل ۶: ارزیابی شکستگی DNA اسپرم توسط تکنیک تانل. (A) گروه کنترل نشان دهنده تعداد محدودی اسپرم تانل مثبت بود. (B) گروه تیمار شده با دوز درمانگاهی بوسولفان تعداد بالای اسپرم تانل مثبت را نشان داد. (C) نمونه کنترل مثبت که تمامی اسپرم‌های موجود در نمونه تانل مثبت بودند (فلش‌ها نشان دهنده اسپرم‌های تانل مثبت است. بزرگنمایی  $40 \times$ ).



شکل ۷: اختلاف در درصد اسپرم‌های تانل مثبت در گروه‌های تیمار شده و کنترل. درصد اسپرم‌های تانل مثبت در گروه دریافت کننده بوسولفان در مقایسه با کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد. نتایج به صورت  $mean \pm SD$  با درجه معنی‌داری  $p < 0.05$  بیان شد (آزمون  $t$  مستقل).



شکل ۸: بررسی حیات اسپرم توسط سنجش  $MTT$  در موش‌های تیمار شده و کنترل. حیات اسپرم کاهش معنی‌داری را در گروه تیمار با بوسولفان در مقایسه با کنترل نشان داد. نتایج به صورت  $mean \pm SD$  با درجه معنی‌داری  $p < 0.05$  بیان شد (آزمون  $t$  مستقل).

## بحث

متعددی بر گندهای هر دو جنس نر و ماده (۱ و ۲)، اسپرماتوژنز و تولید اسپرم طبیعی (۹ و ۱۰) می‌گذارد. براساس بررسی‌های انجام شده بوسولفان واجد اثرات مضر بر باروری موش بوده (۱۷) و (۱۸) و منجر به آزواسپرمی می‌شود (۱۰).

سنجش پارامترهای کیفی اسپرم شامل مورفولوژی و تعداد در

بوسولفان داروی شیمی درمانی است که در کودکان و بالغین به صورت ترکیب با سیکلوفسفامید و کلوفارابین قبل از پیوند مغز استخوان در سرطان خون کاربرد رایجی دارد (۱۶). بوسولفان در تک دوزهای بیش از ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثرات جانبی



سلول‌های سرتولی غالباً چندین روز بعد از تزریق تک دوز سمی بوسولفان مشاهده می‌شود (۶).

نتایج ارزیابی شکستگی کروموزومی اسپرم در مطالعه حاضر، سطوح بالا و معنی‌دار از آسیب DNA و آپوتوزیس را در اسپرم اپیدیدیمی موش‌های تیمار شده با بوسولفان در مقایسه با کنترل نشان داد. درصد بالای اسپرم‌های تانل مثبت و مرگ سلولی آپوتوزیس در اسپرم‌های اپیدیدیمی موش‌های گروه درمان تاییدی بر نتایج مطالعات اخیر بوده (۶) و بیانگر نقش ژنوتوکسیک و پراپوتوتیک دوزهای پایین بوسولفان بر سلول‌های سالم بیماران تحت شیمی درمانی است.

کاهش معنی‌دار در قابلیت حیات اسپرم در گروه تیمار با بوسولفان در مقایسه با کنترل می‌تواند ناشی از اسپرماتوزن ناموفق باشد. نتایج سنجش MTT نشان‌دهنده سمیت سلولی بالای شیمی درمانی با دوزهای درمانگاهی طی اسپرماتوزن در موش است.

بنابراین، حتی دوزهای پایین داروهای آلکیله کننده مورد استفاده در درمان سرطان واجد نتایج ناخواسته ایی در بافت‌های سالم بیماران و به‌خصوص در سلول‌های جنسی بوده و منجر به تغییرات در مورفولوژی طبیعی بافت بیضه، پارامترهای منی و آسیب DNA سلول‌های جنسی می‌شوند. عوارض مخرب داروهای مختلف ضد سرطان به‌عنوان اثر جانبی درمان سرطان در سلول‌های سوماتیک و جنسی قابل توجه هستند.

### نتیجه گیری

نتایج ما بیانگر آثار سوء و سمیت بالای دوز پایین و درمانگاهی داروی شیمی درمانی بوسولفان در سیستم تولید مثلی نر می‌باشد. این مطالعه نشان داد که سمیت بالای سلولی و بافتی حتی طی شیمی درمانی با دوزهای پایین و درمانگاهی در موش مشاهده می‌شود. این امر موید آثار وسیع سیتوتوکسیک، ژنوتوکسیک و پراپوتوتیک بوسولفان در سلول‌های سالم فرد تحت شیمی درمانی بوده و لزوم کاربرد درمان‌های محافظتی مکمل را طی شیمی درمانی در فرد بیمار نشان می‌دهد.

### تشکر و قدردانی

بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات خانم سمیه بهرام زاده و آقای محسن صارمی در انجام موفق این تحقیق کمال سپاس و تشکر را داشته باشیم.

موش‌های تیمار شده با دوز درمانگاهی ۳/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان به‌مدت چهار روز نشان‌دهنده درصد بالایی از آسیب و ناهنجاری اسپرمی در این گروه در مقایسه با کنترل بود. کاهش معنی‌دار در تعداد اسپرم‌های واجد مورفولوژی طبیعی و افزایش ناهنجاری‌های سر، قطعه میانی و دم در گروه تیمار شده با بوسولفان در مقایسه با کنترل بیانگر سمیت بالای این دارو بر روند اسپرماتوزن طبیعی حتی در دوزهای کم و درمانگاهی می‌باشد.

تحقیقات اخیر نشان داد که تیمار موش با تک دوزهای بالای ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم منجر به ایجاد حفراتی در ضخامت لوله‌های سمی‌نیفر اپیدیدیمی و کاهش ارتفاع سلول‌های دیواره کسپه‌های منی ساز (۱۰)، دژنراسیون لوله‌های سمی‌نیفر، لوله‌های طبیعی فاقد اسپرماتوزن، کاهش تعداد اسپرم‌ها و کاهش ضخامت کپسول در بیضه می‌شود (۱).

از سوی دیگر نتایج ارزیابی مورفولوژیک بافت بیضه در تحقیق حاضر موید تحقیقات اخیر بود و نشان داد که ۴ روز تیمار با دوز درمانگاهی روزانه ۳/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان (گروه تیمار با بوسولفان) منجر به افزایش تخریب بافت بیضه در موش‌های بالغ نژاد NMRI شد. کاهش قطر لوله‌های سمی‌نیفر و حذف وسیع سلول‌های زایای دیواره لوله سمی‌نیفر در گروه درمان با بوسولفان در مقایسه با موش‌های کنترل معنی‌دار بود. بنابراین مصرف ۴ دوز پایین از بوسولفان به‌صورت روزانه می‌تواند مانند دوزهای بالای این دارو (۱، ۱۰ و ۱۹) تخریب بافتی وسیع را در بافت بیضه القا کند. حذف شدید دیواره لوله‌های سمی‌نیفر (نوع دوم و سوم) و لوله‌های سمی‌نیفر خالی از سلول (نوع چهارم) بیانگر سمیت بالای سلولی و بافتی شیمی درمانی با دوز پایین است.

داروهای شیمی درمانی می‌توانند آپوتوزیس را در سلول‌های زایای بافت بیضه القا کنند (۳ و ۴). تزریق تک دوز ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان سبب آپوتوزیس در سلول‌های زایای نر به‌خصوص در اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت‌های اولیه شده است (۱۱) و می‌تواند اشکال فراساختاری آپوتوزیس را در سیستم تولید مثلی نر القا کند. تغییراتی مانند چروکیدگی هسته سلول‌های زایا به‌خصوص اسپرماتوگونی‌ها، جدا شدن سلول‌های زایا، حضور فضاهای بزرگ بین سلول‌های مجاور، چروکیدگی سلولی، حضور واکوئل در سلول‌های زایا و اجسام آپوتوتیک در

## منابع

12. Azizollahi S, Aflatoonian R, Sedigi-Gilani MA, Asghari Jafarabadi M, et al. Recruiting Testicular Torsion Introduces an Azoospermic Mouse Model for Spermatogonial Stem Cell Transplantation. *Urol J*. 2014; 11(3): 1648-1655.
13. Kawashima A, Osman BAH, Takashima M, Kikuchi A, Kohchi S, Satoh E, Tamba M, Matsuda M, Okamura N. CABS1 is a Novel Calcium-Binding Protein Specifically Expressed in Elongate Spermatids of Mice. *Biology of reproduction*. 2009; 80: 1293-1304.
14. Momeni HR, Nasimi P. Caspase-dependent apoptosis in motor neurons of adult mouse spinal cord slices. *Iran J Sci Technol*. 2014; 38A1: 55-60.
15. Nasimi, P, Roohi, S. Cell death in animals and plants; Apoptosis, Necrosis & Autophagy. 1<sup>th</sup> Ed. Islamic Azad University of Masjed Soleyman press; 2012.
16. Andersson BS, Valdez BC, Lima MD, Wang X. Clofarabine ± Fludarabine with Once Daily IV Busulfan as Pretransplant Conditioning Therapy for Advanced Myeloid Leukemia and MDS. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011; 17(6): 893-900.
17. Wenzhi M, Lei A, Wu Z, Wang X, et al. Efficient and Safe Recipient Preparation for Transplantation of Mouse Spermatogonial Stem Cells: Pretreating Testes with Heat Shock1. *Biol Rep*. 2011; 85: 670-677.
18. Olooto WE. Infertility in male; risk factors, causes and management- A review. *JMicrobiol. Biotech. Res*. 2012; 2(4): 641-645.
19. Stellflug JN, Green JS, Leathers CW. Ant fertility effect of busulfan and procarbazine in male and female coyotes. *Biol of Rep*. 1983; 33: 1237-1243.
1. Anjamrooz SH, Movahedin M, Mowla SJ, Bairanvand SP. Assessment of morphological and functional changes in the mouse testis and epididymal sperms following busulfan treatment. *Iran Biomed J*. 2007; 11: 15-22.
2. Temitope AA, Tolulope OA, Funlola CT, Khaleed TB, et al. Protective Effect of Tahitian Noni Juice on the Reproductive Functions of Male Wistar Rats Traeted with Cyclophosphamide. *Iran J Pharmacol Ther*. 2011; 10(1): 39-43.
3. Nieto Y, Thall P, Valdez B, Andersson B, et al. High-Dose Infusional Gemcitabine Combined with Busulfan and Melfhalan with Autologous Stem-Cell Transplant in Patients with Refractory Lymphoid Malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012; 18(11): 1677-1686.
4. Choi YJ, Ok DW, Kwon DN, Chung JI, 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 Letters*. 2004; 575(1-3): 41-51.
5. Probin V, Wang Y, Zhou D. Busulfan – induced upsenescence is dependent upon ROS production upstream of the MAPK pathway. *Free Radic Biol Med*. 2007; 42(12):1858-1865.
6. Mohammad Ghasemi F, Bahadori MH, Faghani M, Nasiri E, et al. Buserelin Inhibits Apoptosis in Male Germ Cells Induced by Busulfan in Mouse Testis. *J of Iran Anat Sci*. 2009; 7: 45-54.
7. Probin V, Wang Y, Bai A, Zhou D. busulfan selectively induces cellular senescence but not apoptosis in WI38 fibroblasts via a P53-independent but ERK-P38 MAPK-dependent mechanism. *JPET*. 2006; 319(2): 551-60.
8. Vahdati A, Fathi AR, Nasimi P, Saki GH. Busulfan induces apoptotic and cytotoxic effects on testis and epididymal sperm of adult male mouse following low dose treatment. *IJB*. 2015; 6(5):70-78.
9. Khaki A, Fathiazad F, Nouri M, Khaki AA, et al. The effects of Ginger on spermatogenesis and sperm parameters of rat. *Iran J Reprod Med*. 2009; 7(1): 7-12.
10. Mohamad-Ghasemi F, Faghani M, Fallahkarkan M. The protective effect of melatonin on sperm parameters, epididymis and seminal vesicle morphology in adult mouse treated with busulfan. *J Iran Anat Sci*. 2010; 8: 25-36.
11. Mohammadghasemi F, Soleimanirad J, Ghanbari AA. An Ultrastructural Study on the Apoptotic Features of Spermatogenic Cells following Busulfan Treatment in Adult Mice. *J Reprod Infertil*. 2008; 8(4): 319-329.

## Study of Side Effects of Busulfan on Testis Tissue and Epididymal Sperm of Adult Mice following Treatment with Clinical Dose

Nasimi P, PhD.<sup>1,2</sup>, Vahdati A, PhD.<sup>1,2\*</sup>, Tabandeh MR, PhD.<sup>3</sup>, Khatamsaz S, PhD.<sup>4</sup>

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran
2. Department of Biology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
4. Department of Biology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

\* Email corresponding author: avahdatim@yahoo.com

Received: 8 Apr. 2015

Accepted: 13 Oct. 2015

---

### Abstract

**Aim:** The aim of this study was to assess side effects of clinical dose of busulfan on testis and epididymal sperm of adult male mouse.

**Material and Methods:** Male adult NMRI mice (25-35 g) were divided into two groups of sixteen each. Control and busulfan treated group were administered 100  $\mu$ L DMSO (Dimethyl Sulfoxide) and 3.2 mg/kg busulfan for 4 days, respectively. The animals were sacrificed 35 days after starting treatment. The histological change on germinal epithelium, sperm quality parameters (count and normal morphology), viability and DNA fragmentation on sperm were analyzed by light microscopy, CASA (Computer-aided Sperm Analyzer), MTT (3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide) and TUNEL assays, respectively.

**Results:** Busulfan administration significantly decreased parameters of sperm (count and normal morphology) and increased germinal epithelium destruction. The head, mid piece and tail abnormalities of treated group were increased significantly versus control. The lower levels of MTT in treated group were significant compared with control group. Higher levels of TUNEL positive cells that were found in treated groups demonstrated the increasing of DNA fragmentation in sperms following busulfan treatment.

**Conclusion:** The results showed that clinical dose of busulfan induces genotoxic, pre-apoptotic and cytotoxic effects on spermatogenesis. Also, busulfan can increase cytotoxicity on testis tissue of adult male mouse.

**Key Words:** Apoptosis, Busulfan, Epididymal sperm, sperm viability, Testis