اثرات حفاظتی ویتامین E علیه مسمومیت ناشی از سیکلوسپورین A در بیضه موش صحرائی

حمیدرضا ثامنی [۱،۲*](Ph.D)، سعید حقیقی [۱،۲](M.Sc)، محمدحسن تبریزی‌امجد [۲](M.Sc)

۱- *دانشگاه علوم پزشکی سمنان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی*

۲- *دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح، بخش آناتومی*

چکیده

سابقه و هدف: سیکلوسپورین A (cyclosporine A, CsA) به عنوان یک سرکوب‌گر سیستم ایمنی, در پیوند اعضا و درمان بیماری‌های خود ایمنی استفاده می‌شود. این دارو عامل ایجاد آسیب‌ها و مسمومیت‌های سلولی در اندام‌های مختلف از جمله تولید مثلی می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر حفاظتی احتمالی ویتامین E علیه مسمومیت بیضه‌ای ناشی از سیکلوسپورین A بود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۴۰ سر موش صحرائی نر بالغ از نژاد ویستار به پنج گروه شامل: کنترل (بدون هر گونه مداخله)، دارونما (فقط دریافت روغن زیتون خالص), تجربی ۱ (دریافت داروی CsA با دوز mg/kg ۳۰محلول در روغن زیتون)، تجربی ۲ (دریافت ویتامین E با دوز mg/kg ۱۰۰) و تجربی ۳ (دریافت داروی CsA و ویتامین E با همان دوزها) تقسیم شدند. تمام حیوانات داروها را به مدت سه هفته (روزانه) و به روش گاواژ دریافت کردند. پس از نمونه‌گیری، ثابت‌سازی و آماده‌سازی، از نمونه‌های بیضه مقاطع عرضی ۵ میکرونی تهیه گردید. سپس مقاطع با روش‌های H&E و تری کروم ماسون رنگ‌آمیزی شده و با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به نرم‌افزار کامپیوتری آنالیز تصاویر، هیستومورفومتری شدند.

یافته‌ها: این مطالعه نشان داد که CsA باعث تغییرات تخریبی شدید بافت بیضه شامل؛ کاهش قطر مجاری و ضخامت اپی‌تلیوم منی‌ساز و آسیب سلولی در روند اسپرماتوژنز از جمله: کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرم‌ها می‌شود. از طرفی درمان با ویتامین E باعث کاهش و تعدیل این تغییرات شده و ساختار بیضه و روند اسپرماتوژنز وضعیتی نزدیک به حالت طبیعی را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند که ویتامین E علیه مسمومیت بیضه‌ای ناشی از مصرف نسل جدید CsA دارای اثر محافظتی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سیکلوسپورین A، ویتامین E، بیضه، اسپرماتوژنز، موش صحرایی

مقدمه

به منظور جلوگیری از واکنش‌های دفع پیوند، داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی زیادی به کار می‌روند. سیکلوسپورین A (cyclosporine A, CsA) یک آنتی‌بیوتیک پلی‌پپتید حلقوی قارچی است که به عنوان سرکوب‌گر سیستم ایمنی به طور وسیعی در پیوند اعضاء (به خصوص بقای پیوندهای آلوگرافت) و درمان بیماری‌های خود ایمنی استفاده می‌شود. این دارو اثر خود را از طریق مهار اختصاصی تولید لمفوکین‌ها، مهار افتراق و هدایت پیام توسط گیرنده سطح لنفوسیت‌های T اعمال می‌کند [۱-۹].

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳۱-۳۳۵۴۱۷۰ نمابر: ۰۲۳۱-۳۳۵۴۱۶۱

Email: hrsameni@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۷/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱/۱۴

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که سیکلوسپورین A با افزایش سطح ترومبوکسان B2، فعالیت سیتوکروم P-450، مالونیل دی آلدئید، لاکتات دهیدروژناز، گلیکولیک اکسیداز، گزانتین اکسیداز و به دنبال آن تولید انواع رادیکال‌های آزاد باعث ایجاد حالت نفروتوکسی و هپاتوتوکسی و غیره می‌شود. این اختلالات ممکن است به طور ثانوی منجر به تغییرات تخریبی و اختلال عمل‌کرد بیضه شوند [۱۰،۸،۶،۵،۴].

Seethalakshmi و همکاران در سال ۱۹۸۷ برای اولین بار گزارش کردند که مصرف CsA در بیماران پیوندی علاوه بر اثرات نفروتوکسی و هپاتوتوکسی، باعث تغییرات تخریبی و آتروفی لوله‌های منی‌ساز، کاهش تعداد و حرکت اسپرم و بدشکلی‌های اسپرم در مجاری اپیدیدیم شده و در نتیجه منجر به ناباروری مردان می‌گردد [۱۱]. هرچند Chen و همکارانش در سال ۱۹۸۸ گزارش کردند تجویز روزانه CsA با دوز ۱۰mg/kg بر پارامترهای ساختاری بیضه اثرات مخرب چندانی ندارد [۱۲].Srinivas و همکاران در سال ۱۹۹۸ و Masuda و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند CsA از طریق تضعیف روند تکاملی اسپرم، کاهش فعالیت فاگوسیتوزی سلول‌های سرتولی، کاهش وزن بیضه، کاهش تعداد اسپرم‌ها، کاهش سطح تستوسترون و افزایش سطح LH و FSH سرم بر خلاف تئوری قبلی باعث آسیب ساختار بافتی بیضه شده و در عمل‌کرد آن اختلال ایجاد می‌کند [۱۳،۱]. Turk و همکارانش در سال‌های ۲۰۰۷ و ۲۰۱۰ نشان دادند که تجویز CsA با دوز mg/kg ۱۵ به مدت ۲۱ روز در موش‌های صحرایی به طور معنی‌داری باعث کاهش وزن بیضه، پروستات قدامی، غلظت اسپرم اپیدیدیمی، حرکت اسپرم، کاهش قطر لوله‌های منی‌ساز و ضخامت لایه سلول‌های جرم می‌گردد. هم‌چنین باعث کاهش پارامترهای آنتی‌اکسیدان بیضه‌ای مثل؛ گلوتاتیون، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز و افزایش سطح مالون دی‌آلدئید بیضه‌ای می‌شود [۱۴،۲].

مطالعات قبلی ثابت کرده‌اند که مکانیسم آسیب‌زایی ناشی از مصرف CsA ممکن است نتیجه عوامل مختلفی شامل؛ استرس اکسیداتیو، اختلال در محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گناد و اثرات مسمومیت سلولی مستقیم بر ساختار بیضه، به ویژه کاهش فعالیت فاگوسیتوزی سلول‌های سرتولی باشد یا به طور ثانوی متعاقب اثرات نفروتوکسی و هپاتوتوکسی ناشی از آن باشد [۱۵،۱۴،۱۳،۱].

ویتامین E با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود به عنوان خط مقدم دفاع علیه پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشاهای سلولی عمل کرده و بیش‌ترین فعالیت زیستی آنتی‌اکسیدانی را دارد. مصرف هم‌زمان این ویتامین با داروی CsA می‌تواند به مقدار زیادی از ایجاد استرس اکسیداتیو و آزارهای سلولی از جمله نفروتوکسی و هپاتوتوکسی در بافت‌های مختلف، از طریق مهار پراکسیداسیون لیپیدها و نیز افزایش بیان و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز جلوگیری نماید [۱۷،۱۶،۵،۱].

از آن‌جایی‌که امروزه تعداد زیادی از بیماران پیوندی، جوان و در سنین باروری هستند، بنابراین ممکن است درمان طولانی مدت با CsA عمل‌کرد تولید مثلی و باروری آن‌ها را دچار اختلال کرده و در نهایت منجر به عقیمی در این افراد گردد. تحقیق حاضر به منظور بررسی اثرات حفاظتی احتمالی ویتامین E علیه مسمومیت و تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از مصرف نسل جدید داروی سیکلوسپورین A بر بیضه موش صحرائی انجام گردید.

مواد و روش‌ها

حیوانات و درمان دارویی. در این مطالعه تجربی از تعداد ۴۰ سر موش صحرائی (Rat) نر بالغ از نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۲۰ – ۲۰۰ گرم استفاده گردید. موش‌ها از مرکز تهیه و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی سمنان تهیه و در قفس‌های پلاستیکی در یک اتاق کنترل شده از نظر حرارت (۲۲±۲°C) و رطوبت (۶۵-۶۰ درصد) و سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند. به تمام حیوانات اجازه داده می‌شد تا از آب و غذای استاندارد آزادانه استفاده کنند. این طرح با کسب

Archive of SID
www.SID.ir

مجوز از کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی سمنان انجام شد.

حیوانات به طور تصادفی به پنج گروه کنترل، دارونما، تجربی ۱، تجربی ۲ و تجربی ۳ (۸ سر در هر گروه) تقسیم و وزن آن‌ها در شروع درمان اندازه‌گیری می‌شد.حیوانات گروه کنترل تحت هیچ مداخله‌ای قرار نگرفتند، حیوانات گروه دارونما فقط با روغن زیتون خالص (Extra virgin, Carbonell, Spain) به میزان یک میلی‌لیتر، حیوانات گروه تجربی ۱ با داروی سیکلوسپورین A (Sandoz, Basle, Switzerland Sandimmune–Neoral) با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت محلول در یک میلی‌لیتر روغن زیتون، حیوانات گروه تجربی ۲ با ویتامین E با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و حیوانات گروه تجربی ۳ به صورت هم‌زمان با داروی سیکلوسپورین A و ویتامین E و همان دوزها به مدت سه هفته (روزانه) و از طریق گاواژ تحت درمان بودند.

ارزیابی هیستومورفومتری. یک روز پس از اتمام درمان، تمام حیوانات کشته شده و نمونه بیضه آن‌ها خارج و بلافاصله پس از توزین، عمل ثابت‌سازی نمونه‌ها با محلول فرمال سالین به مدت ۴- ۳ روز انجام شد. پس از انجام مراحل آماده‌سازی و قالب‌گیری، از نمونه‌ها برش‌های پنج میکرونی تهیه و با روش‌های H&E و تری کروم ماسون رنگ‌آمیزی شدند. به منظور بررسی‌های کمی و هیستومورفومتریک ساختار بافتی بیضه, ابتدا از هر یک از گروه‌های مورد مطالعه تعداد پنج عدد لام میکروسکوپی به طور تصادفی انتخاب و در هر یک از مقاطع بیضه ۱۰ مقطع کاملاً عرضی از لوله‌های منی‌ساز و در مرحله پنج اسپرماتوژنز سیکل اپی‌تلیوم زایا انتخاب گردید. سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به گراتیکول چشمی صفحه شطرنجی مدرج و متصل به کامپیوتر حاوی سیستم نرم‌افزار آنالیز مورفومتریک تصاویر بافتی (Motic images china group Co., LTD) در بزرگ‌نمایی ۴۰۰× پارامترهای مختلفی از جمله: قطر لوله‌های منی‌ساز, ضخامت اپیتلیوم منی‌ساز, اندازه سلول‌های اسپرماتوگونیا, اسپرماتوسیت اولیه پاکی‌تن, لیدیگ و هسته سلول‌های سرتولی در دو جهت افقی و عمودی (عمود بر هم) اندازه‌گیری شد. در مقطع هر لوله منی‌ساز تعداد کل سلول‌های اسپرماتوزوآ، اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیت اولیه پاکی‌تن و سرتولی و نیز تعداد سلول‌های لیدیگ موجود در ۱۰ منطقه از بافت هم‌بند بینابینی قابل هم‌پوشانی با کادر گراتیکول چشمی مدرج شمارش شدند. درصد حجمی بافت هم‌بند بینابینی نیز به‌طور تصادفی در ده منطقه از هر برش بیضه گروه‌های مختلف با استفاده از روش شمارش نقاط محاسبه گردید.

روش تجزیه و تحلیل آماری. داده‌های کمی به‌دست آمده از گروه‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۵ و آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون توکی- کرامر تجزیه و تحلیل شدند. در مواردی که مقدار F به‌دست آمده معنی‌دار بود از آزمون تکمیلی توکی- کرامر برای مقایسه بین هر دو گروه تجربی استفاده شد. تمام داده‌ها به صورت Mean±SEM ارائه شده و P<۰/۰۵ به عنوان معیار معنی‌دار بودن در نظر گرفته شد.

نتایج

یافته‌های هیستوپاتولوژی. در گروه‌های کنترل و دارونما ساختار بافتی بیضه، مجاری منی‌ساز و و اپی‌تلیوم زایای آن کاملاً منظم و طبیعی بود و تغییرات آتروفیک و دژنراتیو چندانی مشاهده نگردید. در گروه تجربی ۱ ساختار بافتی و سلولی بیضه دچار بی‌نظمی و تغییرات دژنراتیو گسترده شده بود و تغییراتی شامل: آتروفی و بهم ریختگی مجاری منی‌ساز، بی‌نظمی در غشاء پایه مجاری همراه با جدا شدگی سلول‌های اسپرماتوگونی از آن قابل مشاهده بود. هم‌چنین در اپی‌تلیوم منی‌ساز با وجود ظاهری مطبق، طبقات سلولی دارای آرایشی نامنظم بوده و در بعضی از مجاری توده‌های هیالینی حاوی هسته‌های متعدد و کوچک در لومن قابل مشاهده بود. سلول‌های سرتولی نیز در اپی‌تلیوم زایا به تعداد کم‌تر و اکثراً با موقعیت قاعده‌ای و نزدیک غشاء پایه قابل تشخیص بودند. گاهی مجاری منی‌ساز در حیوانات تحت درمان با

Archive of SID

www.SID.ir

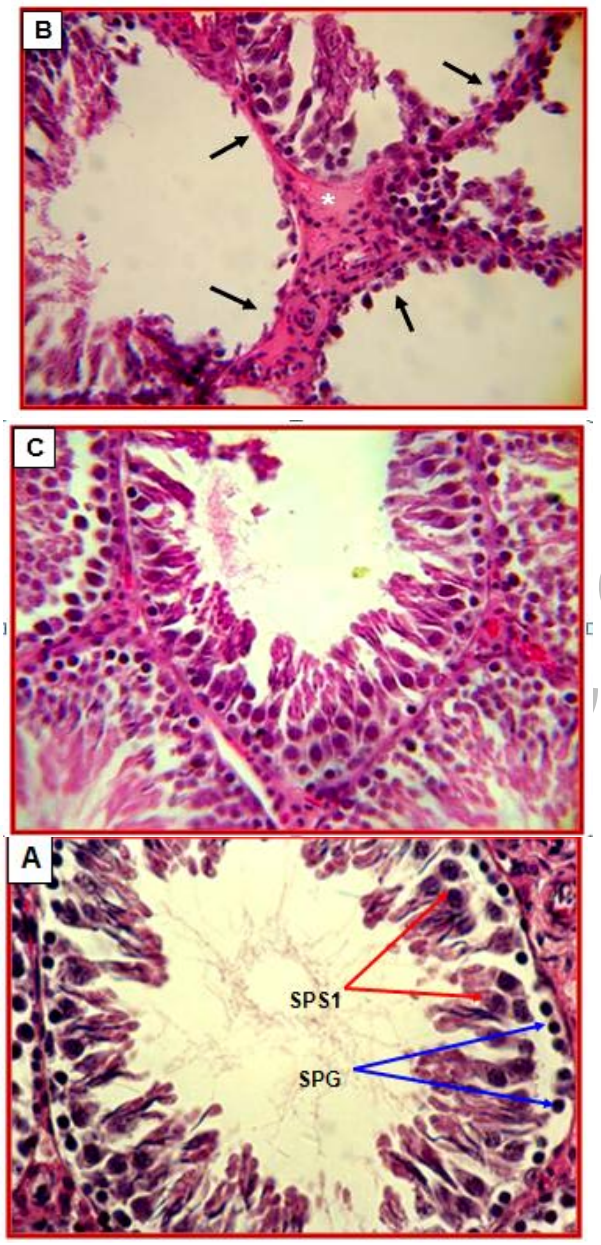
سیکلوسپورین A فاقد لومن مرکزی بودند که احتمالاً به دلیل غیر فعال شدن سلول‌های سرتولی می‌باشد (شکل ۱، A, B).

بافت هم‌بند بینابینی بیضه در گروه تحت درمان با CsA، تقریباً همانند گروه‌های دیگر حاوی تمام اجزاء و سلول‌ها بود ولی از تراکم و یک‌نواختی آن‌ها کاسته شده و حالت فیبروز و ادم قابل مشاهده بود. کپسول بیضه (تونیکا آلبوژینه آ) در این گروه ظاهری شبیه گروه‌های کنترل و دارونما داشته ولی افزایشی در تراکم رشته‌های کلاژن نسبت به سلول‌ها قابل مشاهده بود (شکل ۲، D, E).

بافت بیضه حیوانات گروه‌های تجربی ۲ و ۳ از لحاظ ساختار هیستومرفولوژیکی تا حدود زیادی شبیه گروه‌های کنترل و دارونما بود. بررسی‌های بافت‌شناسی بیضه حیوانات در گروه تجربی ۳ (تحت درمان هم‌زمان با سیکلوسپورین A و ویتامین E) نشان داد که اکثر تغییرات تخریبی و بی‌نظمی‌های ایجاد شده توسط داروی CsA، با تجویز ویتامین E برگشت و تعدیل یافته بود. به طوری‌که مجاری منی‌ساز نمایی طبیعی داشته و اپی‌تلیوم زایا نیز تا حدود زیادی سازمان یافتگی و حالت مطبق خود را بازیافته بود و بهم ریختگی کاهش یافته بود. غشاء پایه نیز تقریباً به وضعیت طبیعی خود نزدیک شده بود (شکل ۱، A, B, C). بافت هم‌بند بینابینی بیضه نیز در گروه تحت درمان با ویتامین E از لحاظ ساختار شبیه گروه‌های کنترل و دارونما بوده و سلول‌ها، رشته‌ها و عروق خونی از یک تراکم و نظم نسبتاً طبیعی برخوردار بودند (شکل ۲، F).

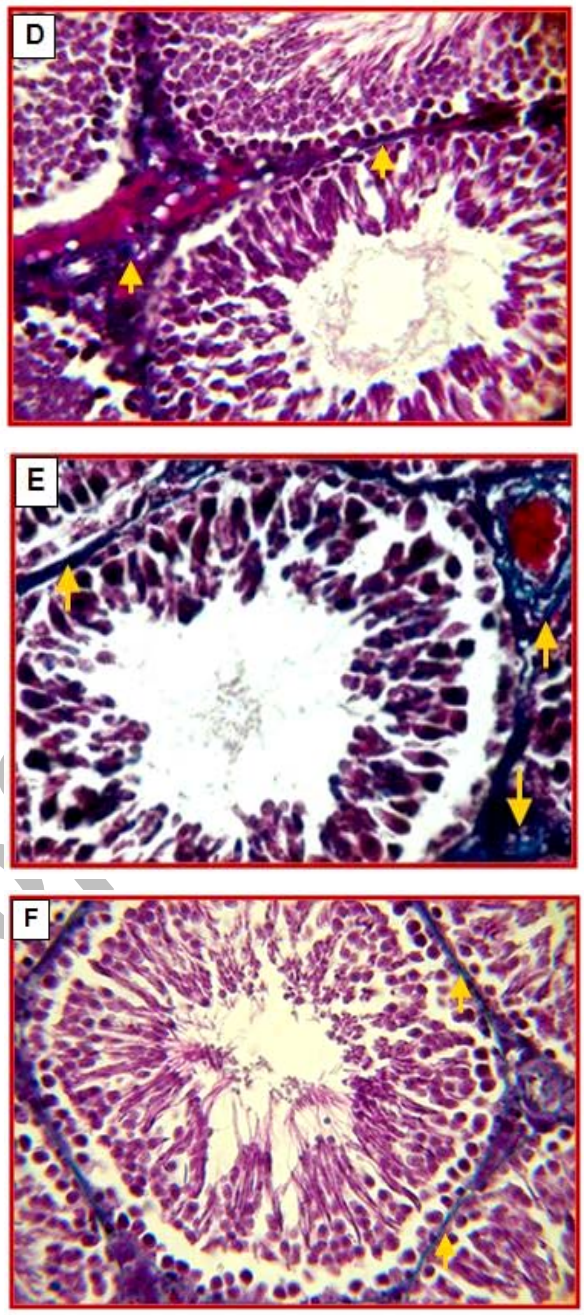
یافته‌های هیستومورفومتری. میانگین وزن بیضه گروه تجربی تحت درمان با داروی سیکلوسپورین A نسبت به گروه‌های کنترل و دارونما و نیز گروه‌های تجربی ۲ و ۳ کاهش معنی‌داری را نشان داد. همین میانگین علی‌رغم کاهش در گروه تجربی ۳ نسبت به گروه‌های کنترل و دارونما از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (P<۰/۰۵) (جدول ۱).

میانگین مقادیر قطر مجاری منی‌ساز و ضخامت اپی‌تلیوم مجاری منی‌ساز در گروه تجربی ۱ کاهش معنی‌داری پیدا کرده بود (P<۰/۰۰۱) (جدول ۱). درمان با ویتامین E از این کاهش جلوگیری کرده و حتی باعث افزایش معنی‌دار میانگین ضخامت اپی‌تلیوم منی‌ساز شده بود (P<۰/۰۰۱). میانگین قطر مجاری منی‌ساز در گروه تجربی ۳ نسبت به گروه‌های کنترل و دارونما کاهش یافته بود ولی این تغییر معنی‌دار نبود (جدول ۱).



شکل ۱. نمای میکروسکوپ نوری لوله های سمینی فر بیضه موش صحرایی درگروههای دارونما، تجربی ۱ و تجربی ۳. (A) لوله های منی ساز با اپی تلیوم منظم و یکنواخت، سلولهای اسپرماتوگونی (SPG) و اسپرماتوسیت اولیه (SPS1) مشخص و فراوان در گروه دارونما، (B) بی نظمی در لوله های منی ساز و کنده شدگی اپی تلیوم (پیکانها) ، سلولهای اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت اولیه پراکنده و ادم بافت بینابینی (*) در گروه تجربی ۱ و (C) نمای لوله های منی ساز شبیه گروه کنترل در گروه تجربی ۳. رنگ آمیزی H&E، ۴۰۰×.

www.SID.ir
Archive of SID



شکل ۲. نمای میکروسکوپ نوری لوله های سمینی فر بیضه موش صحرایی درگروههای دارونما، تجربی ۱ و تجربی ۳. (D) تراکم کم و رنگ پذیری ضعیف رشته های کلاژن (سر پیکان) در بافت همبند بینابینی گروه دارونما، (E) تراکم بالا و رنگ پذیری شدید رشته های کلاژن (پیکانها) در بافت همبند بینابینی گروه تجربی ۱ و (F) تراکم و رنگ پذیری رشته های کلاژن (سر پیکان) در بافت همبند بینابینی گروه تجربی ۳ شبیه گروه دارونما می باشد. رنگ آمیزی تری کروم ماسون، ۴۰۰×.

شمارش دقیق انواع سلول‌های اسپرماتوژنیک اپی‌تلیوم منی‌ساز نشان داد که میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوزوآ، اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه پاکی تن واقع در مرحله پنج اسپرماتوژنز سیکل اپی‌تلیوم منی‌ساز در گروه تجربی ۱ در مقایسه با گروه‌های کنترل و دارونما کاهش معنی‌داری یافته بود. تجویز ویتامین E همزمان با سیکلوسپورین A از کاهش تعداد این سلول‌ها جلوگیری کرده و حتی به طور معنی‌داری باعث افزایش آن‌ها گردید (P<۰/۰۱) (شکل ۳، A, B, C). هم‌چنین میانگین تعداد سلول‌های سرتولی و لیدیگ بیضه در گروه تجربی ۱ نسبت گروه‌های کنترل و دارونما کاهش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۴)، در صورتی‌که این میانگین‌ها در گروه تجربی تحت درمان همزمان با سیکلوسپورین A و ویتامین E نسبت به گروه تجربی ۱ افزایش معنی‌داری پیدا کرده بود (P<۰/۰۲) (شکل ۳، D, E). از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری در پارامترهای فوق بین گروه‌های تجربی ۲ و ۳ با گروه‌های کنترل و دارونما مشاهده نگردید (P<۰/۰۵) (شکل ۳، A, B, C). مقایسه میانگین اندازه انواع سلول‌های اسپرماتوگونی, اسپرماتوسیت اولیه پاکیتن, لیدیگ و هسته سلول سرتولی بین گروه‌های تجربی و دارونما نشان داد که اندازه این پارامترها در گروه تجربی تحت درمان با داروی سیکلوسپورین A کاهش پیدا کرده است ولی علی‌رغم نزدیک بودن به سطح P<۰/۰۵، از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (P<۰/۰۷).

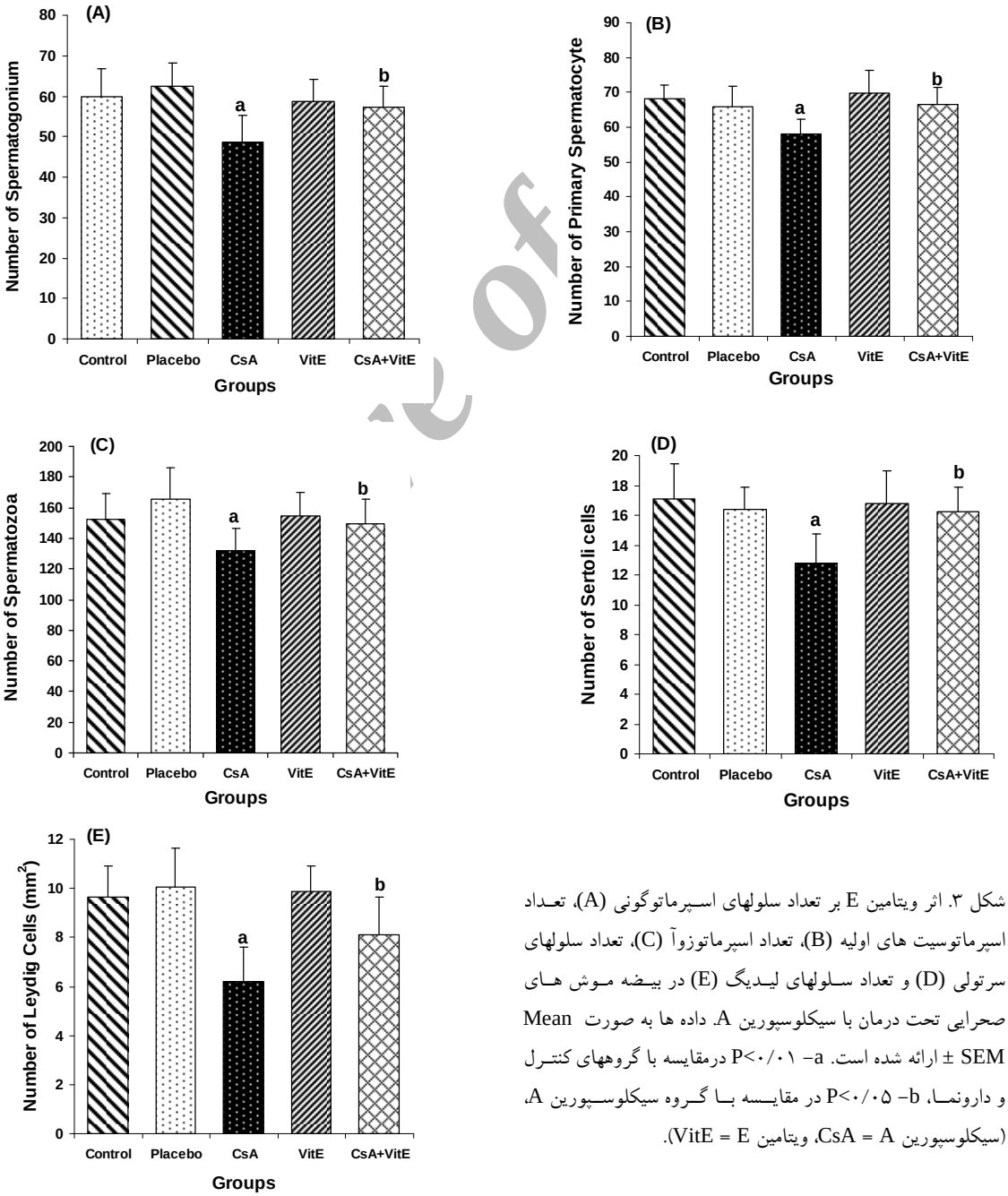
میانگین درصد حجمی بافت هم‌بند بینابینی بیضه در گروه تجربی ۱ نسبت به گروه‌های کنترل و دارونما از لحاظ آماری افزایش معنی‌داری یافته بود (P<۰/۰۵). از طرف دیگر این میانگین در گروه تجربی ۲ نسبت به گروه‌های کنترل و دارونما تغییر چندانی پیدا نکرده بود. در گروه تجربی ۳ میانگین مذکور نسبت به گروه‌های کنترل و دارونما افزایش، ولی در مقایسه با گروه تجربی ۱ کاهش معنی‌داری یافته بود (P<۰/۰۵) (جدول ۱).

www.SID.ir

جدول ۱. مقایسه مقادیر میانگین ± انحراف معیار وزن بیضه، قطر مجاری منی ساز، ضخامت اپی تلیوم منی ساز و درصد حجمی بافت بینابینی بیضه بین گروه‌های مختلف مورد مطالعه.

گروهها / متغیرها	کنترل N=8	دارونما N=8	تجربی ۱ N=8	تجربی ۲ N=8	تجربی ۳ N=8
وزن بیضه (میلی گرم)	۳/۰۲±۰/۱۲	۲/۹۴±۰/۲۳	۲/۱۸±۰/۱۴ *	۲/۷۵±۰/۱۹ #	۲/۷۷±۰/۱۸ #
قطر مجاری منی ساز (میکرومتر)	۲۵۹ ±۱۷	۲۵۳/۳±۱۷/۷۲	۲۱۵/۶±۱۳/۴۳*	۲۵۰/۳±۱۱/۵۳#	۲۴۵/۲±۱۸/۵۷ #
ضخامت اپی تلیوم منی ساز (میکرومتر)	۶۹/۵±۳/۸۶	۶۹/۸۵±۶/۱	۵۱/۷۵±۳/۳۵ *	۶۸/۹۵±۴/۱۸ #	۶۹/۵۳±۳/۷ #
درصد حجمی بافت بینابینی (mm^3)	۱۲/۸±۳/۶۷	۱۱/۶±۵/۷۶	۱۸/۷±۳/۳۲ *	۱۲/۴±۵/۴۸	۱۴/۴±۳/۳۷

*: اختلاف معنی داری در سطح P<۰/۰۵ بین گروه‌های کنترل و دارونما با گروه تجربی ۱ و #: اختلاف معنی داری در سطح P<۰/۰۵ بین گروههای تجربی ۲و ۳ با گروه تجربی ۱.



شکل ۳. اثر ویتامین E بر تعداد سلولهای اسپرماتوگونی (A)، تعداد اسپرماتوسیت های اولیه (B)، تعداد اسپرماتوزوآ (C)، تعداد سلولهای سرتولی (D) و تعداد سلولهای لیدیگ (E) در بیضه موش های صحرایی تحت درمان با سیکلوسپورین A. داده ها به صورت Mean ± SEM ارائه شده است. a– P<۰/۰۱ درمقایسه با گروههای کنترل و دارونما، b– P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه سیکلوسپورین A، (سیکلوسپورین A = CsA، ویتامین E = VitE).

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تحقیق حاضر حاکی از تغییرات غیر طبیعی و تخریبی ساختار بافتی بیضه به صورت بی‌نظمی در اپی‌تلیوم منی‌ساز، کاهش شدید در تعداد و اندازه سلول‌های دودمان اسپرماتوزوئید و بافت بینابینی شامل اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، سرتولی، لیدیگ و نیز تغییرات پاتولوژیک در بافت هم‌بند بینابینی حیوانات گروه تجربی تحت درمان با سیکلوسپورین A بود. این تغییرات با گزارشات محققین دیگر که نشان دادند داروی سیکلوسپورین A بر روی ساختار و عمل‌کرد اندام‌های تولید مثلی موش‌های صحرایی نر اثرات تخریبی و تاخیری شدیدی دارد، کاملاً مطابقت دارد [۲۰،۱۹،۱۸،۱۳،۱].

در این تحقیق وزن بیضه حیوانات گروه‌های تجربی به ویژه گروه تجربی ۱ (تحت درمان با دوز ۳۰mg/kg سیکلوسپورین A) نسبت به گروه‌های کنترل و دارونما کاهش معنی‌داری پیدا کرده بود که این نتیجه در راستای یافته‌های مطالعات دیگر است. از طرفی، حیواناتی که همراه داروی CsA، ویتامین E دریافت کرده بودند در وزن بیضه آن‌ها کاهش شدیدی مشاهده نشد که یعنی ویتامین E به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی نقش بسیار مهمی در کاهش اثرات سمی و هیستوپاتولوژیک سیکلوسپورین بر روی بافت بیضه ایفا می‌کند [۱۶،۸،۵].

در مطالعه حاضر مصرف CsA باعث کاهش معنی‌دار قطر مجاری منی‌ساز و ضخامت اپی‌تلیوم زایای آن‌ها گردید. هم‌چنین تغییرات تخریبی، نکروز، ادمای بافت بینابینی، ریزش سلول‌های زاینده و اختلال در فرآیند اسپرماتوژنز مجاری منی‌ساز موش‌های صحرایی تحت درمان با CsA مشاهده گردید. این یافته‌ها در راستای مطالعات اخیری است که تغییرات مشابهی را در ساختار بافتی بیضه مشاهده کردند و آن‌را وابسته به استرس اکسیداتیو ناشی از کاربرد بعضی عوامل سیتوتوکسیک می‌دانند. با توجه به ماهیت چربی دوست سیکلوسپورین، این دارو قادر است به طور سریع و وسیع در تمام اندام‌ها و بافت‌ها نفوذ کرده و از طرق مختلف از جمله: تغییر در نفوذپذیری غشاء سیتوپلاسمی، دخالت در سیستم تولید انرژی سلول و افزایش فعالیت سیتوکروم P-450 آسیب‌های سلولی زیادی از جمله در سلول‌های سرتولی و لیدیگ ایجاد کند. از طرف دیگر CsA به طور غیر مستقیم محرک پراکسیداسیون لیپیدی و تولید انواع رادیکال‌های آزاد فعال در اندام‌های مختلف از جمله بیضه بوده و نهایتاً باعث تخریب و آتروفی ساختار، مرگ سلولی و اختلال عمل‌کرد بیضه می‌گردد [۲۲،۲۱،۹،۸،۶].

یافته‌های ما حاکی از تغییرات غیر طبیعی بافت بیضه و کاهش شدید در تعداد و اندازه بسیاری از سلول‌های اپی‌تلیوم زایای مجاری منی‌ساز در حیوانات تحت درمان با داروی CsA است. این تغییرات عمدتاً شامل: کاهش معنی‌دار در تعداد و اندازه سلول‌های اسپرم, اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتوگونی است که البته معنی‌دار نبود. جالب این‌که در گروه تجربی ۳ که هم‌زمان داروی CsA و ویتامین E را دریافت کرده بودند نه تنها کاهشی در تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک مشاهده نشد بلکه نسبت به گروه تجربی CsA حتی افزایش معنی‌داری به‌خصوص در تعداد اسپرم‌ها و اسپرماتوسیت‌های اولیه مشاهده گردید.

Iwasaki در سال ۱۹۹۱ با درمان موش‌های صحرایی نر توسط دوزهای مختلف CsA نشان داد که تعداد و حرکت اسپرم و درصد لوله‌های منی‌ساز حاوی اسپرم در مدت ۲ الی ۶ هفته پس از مصرف داروی فوق کاهش معنی‌داری پیدا می‌کنند که این تغییرات وابسته به دوز هستند [۱۸]. Sirinivas در ۱۹۹۸ گزارش کرد که در موش‌های صحرایی تحت درمان با سیکلوسپورین (دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) تعداد اسپرم‌ها, جمعیت سلول‌های هاپلوئید مجاری منی‌ساز و سطح تستوسترون سرم کاهش معنی‌داری پیدا می‌کنند [۱۳]. Masuda در ۲۰۰۳ نشان داد که CsA باعث کاهش تعداد اسپرماتوزوآ, بدشکلی‌های اسپرماتیدها, افزایش اجسام باقیمانده, تغییرات دژنراتیو شدید در مجاری منی‌ساز و افزایش اسپرماتیدهای گرد دژنره شده و اسپرم‌های غیر طبیعی در مدت دو هفته پس از مصرف می‌گردد [۱]. این گزارشات و

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج حاصل از مطالعات مشابه دانش‌مندان دیگر, یافته‌های تحقیق حاضر را تایید می‌کنند.

اگر چه هنوز مکانیسم آسیب‌زایی سیکلوسپورین در ایجاد تغییرات بافتی بیضه و فرآیند اسپرماتوژنز مشخص نشده است ولی دو فرضیه در این مورد قابل ارائه است. یکی این‌که تمام اثرات مصرف داروی سیکلوسپورین از جمله تغییرات دژنراتیو و اختلال عمل‌کرد بیضه ممکن است به صورت ثانوی ناشی از اثرات هپاتوتوکسی و نفروتوکسی آن باشد. زیرا مشخص شده است، اختلال عمل‌کرد کبد و ضایعات کلیوی, عمل‌کرد بیضه‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند [۸]. از طرف دیگر Seethalakshmi و همکارانش نشان دادند که عمل‌کرد کلیه تحت تاثیر دوز بالای سیکلوسپورین کاهش می‌یابد در حالی‌که کارکرد کبد چندان تحت تاثیر این دارو قرار نمی‌گیرد. آن‌ها هم‌چنین نشان دادند تغییراتی که بعد از مصرف داروی فوق در اسپرماتوژنز و بیضه اتفاق می‌افتد به طور کامل به‌وسیله ضایعات کلیوی ناشی از مصرف دارو نیست بلکه عمل‌کرد تولید مثلی حتی در حیواناتی که در معرض دارو با دوز کم و عمل‌کرد طبیعی کلیه بوده‌اند نیز تغییر می‌یابد [۲۰،۱۱]. مطالعه حاضر نیز در راستای یافته‌های محققین دیگر تا حدود زیادی آشکار کرد که احتمالاً تغییرات ایجاد شده در بیضه نتیجه اثر مستقیم داروی سیکلوسپورین بر روی سیستم تولید مثلی نر می‌باشد. بنابراین با توجه به این‌که عمل‌کرد تولید مثلی حتی در حیواناتی که در معرض دوز پائین دارو و عمل‌کرد طبیعی کلیه بوده‌اند نیز تغییر می‌یابد در نتیجه این فرضیه چندان مطمئن نیست.

از طرف دیگر به‌خوبی می‌دانیم که فرآیند اسپرماتوژنز و بلوغ اسپرم به غلظت بالای آندروژن داخل بیضه‌ای و گردش خون وابسته است [۸]. بنابراین کاهش در غلظت آندروژن‌ها به احتمال قوی به اسپرماتوژنز و بلوغ اسپرم لطمه و صدمه می‌زند.

مطالعات مختلف ثابت کرده‌اند که داروی CsA حتی در مقادیری که ضایعات کلیوی ندارد، باعث کاهش سطح تستوسترون و افزایش سطح LH و FSH سرم می‌شود. این مطالعات هم‌چنین پیشنهاد می‌کنند که یافته‌های فوق احتمالاً نتیجه تخریب و آسیب سلول‌های لیدیگ، سرتولی و یا مهار مکانیسم سنتز استروئیدهای بیضه‌ای است که باعث کاهش تولید آندروژن‌ها شده و متعاقب آن تغییرات تخریبی در بیضه اتفاق افتاده و فرآیند اسپرماتوژنز، بلوغ اسپرم، مرفولوژی و حرکت اسپرم نیز دچار اختلال می‌گردد [۱۳،۱۱،۸،۱].

در مطالعه حاضر هم‌چنین مشخص شد که داروی CsA باعث کاهش معنی‌داری تعداد سلول‌های سرتولی و لیدیگ بیضه می‌شود. ولی تجویز ویتامین E همزمان با داروی CsA در گروه تجربی ۳ از کاهش در تعداد سلول‌های فوق جلوگیری کرده و باعث افزایش معنی‌داری در تعداد آن‌ها گردید. هم‌چنین اندازه هسته سلول‌های سرتولی و اندازه سلول‌های لیدیگ بیضه موش‌های گروه تجربی ۱ نسبت به گروه‌های دیگر کاهش یافته بود که نشان‌دهنده آتروفی سلول‌های مذکور است، البته این کاهش علی‌رغم نزدیک بودن به سطح P<۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

در این تحقیق مشاهده شد که داروی CsA در موش‌های صحرائی گروه ۱ منجر به ایجاد تغییرات دژنراتیو شدید بافتی بیضه شده است که این تغییرات احتمالاً هم‌زمان با آغاز کاهش سطح تستوسترون سرم و بیضه بوده و در نتیجه مرتبط با آسیب و آتروفی سلول‌های سرتولی و لیدیگ است. همان‌طور که می‌دانیم تنظیم هورمونی اسپرماتوژنز از طریق اثر آندروژن‌ها و FSH بر روی سلول‌های سرتولی ایجاد می‌شود، زیرا این سلول‌ها حاوی گیرنده‌های آندروژنی و FSH هستند. بنابراین تغییرات مشاهده شده در ساختار بافتی بیضه موش‌های تحت درمان با داروی CsA ممکن است ناشی از کاهش سطح هورمون تستوسترون باشد.

بر اساس یافته‌های اخیر یکی از قوی‌ترین تئوری‌ها که احتمالاً در مکانیسم آسیب‌زایی مسمومیت بیضه‌ای و اسپرماتوزوآیی به دنبال مصرف CsA مطرح می‌باشد، تغییراتی در محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- بیضه است که باعث آسیب و کاهش فعالیت فاگوسیتوزی سلول‌های سرتولی، آسیب و آتروفی سلول‌های لیدیگ و مهار سنتز استروئیدهای بیضه‌ای و

Archive of SID

www.SID.ir

به دنبال آن کاهش تولید آندروژن‌ها شده و در نهایت منجر به تحریک تغییرات تخریبی در اپی‌تلیوم زایای مجاری منی‌ساز می‌شود [۲۱،۲۰،۸،۴].

از طرف دیگر کاربرد ویتامین E در حیوانات تحت درمان با داروی سیکلوسپورین A باعث بهبود معنی‌دار وزن بیضه، قطر لوله‌های منی‌ساز و ضخامت اپی‌تلیوم زایا و تعدیل تمام آسیب‌های ساختاری و تغییرات هیستوپاتولوژیک بیضه می‌گردد. این موضوع نشان‌دهنده این‌است که احتمالاً سطح تستوسترون سرم و داخل بیضه توسط ویتامین E به‌تدریج تعدیل یافته و به وضعیت طبیعی نزدیک شده است. از طرف دیگر احتمالاً ویتامین E قادر است با تقویت و بهبود نقش کنترلی محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- بیضه و کاهش اثرات سمی سیکلوسپورین بر روی غشاء پلاسمائی و میتوکندری سلول‌ها، از آسیب و ضایعات اپی‌تلیوم منی‌ساز، سلول‌های سرتولی و لیدیگ جلوگیری کند.

در نتیجه می‌توان گفت: این مطالعه به طور واضح نشان داد که فرمول جدید داروی سیکلوسپورین A نیز بدون عوارض جانبی نبوده و آسیب‌های ساختاری و عملکردی وسیعی در بافت بیضه و روند تولید اسپرم ایجاد می‌کند، هم‌چنین مشخص شد که ویتامین E بر روی مسمومیت بیضه‌ای ناشی از مصرف سیکلوسپورین A دارای پتانسیل حفاظتی احتمالی می‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌گردد در بیماران پیوندی به ویژه افراد جوانی که داروی CsA دریافت می‌کنند حتی‌المقدور ویتامین E به صورت مکمل تجویز شود تا از آسیب باروری وابسته به CsA تا حدود زیادی جلوگیری گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سمنان که با تامین اعتبار لازم امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند، هم‌چنین از سرکار خانم فامیلی کارشناس محترم بخش بافت‌شناسی و پرسنل محترم حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی سمنان به خاطر همکاری صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

[1] Masuda H, Fujihira S, Ueno H, Kagawa M, Katsuoka Y, Mori H. Ultrastructural study on cytotoxic effects of cyclosporine A in spermiogenesis in rats. Med Electron Microsc 2003; 36: 183-191.

[2] Turk G, Sonmez M, Ceribasi AO, Yuce A, Atessahin A. Attenuation of cyclosporine A-induced testicular and spermatozoal damages associated with oxidative stress by ellagic acid. Int Immunopharmacol 2010;10:177-182.

[3] Rezzani R. Exploring cyclosporine A-side effects and the protective role-played by antioxidants: the morphological and Immunohistochemical studies. Histol Histopathol 2006;21:301-316.

[4] Adhirai M, Selvam R. Effect of cyclosporine on liver antioxidants and the protective role of vitamin E in hyperoxaluria in rats. J Phrm Phrmacol 1998; 50: 501-505.

[5] Durak I, Karabacak HI, Büyükkoçak S, Cimen MY, Kaçmaz M, Omeroglu E, Oztürk HS. Impaired antioxidant defense system in the kiedny tissues from rabbit's trested with cyclosporine: Protective effects of vitamins E and C. Nephron 1998; 78: 207-211.

[6] Shu Y, Yaung GY, zhang WL, Hu ZL. Effects of cyclosporine A on expression of Fasl and Fas in the contralateral testis after the unilateraltestis injured in KM mouse. Zhonghua Nan Ke Xue 2002; 8: 201-206.

[7] Clipstone NA, Fiorenrino Df. and Crabtree GR. Molecular analysis of the interaction of calcineurin with Drug-Immunophilin complexs. J Biol Chem 1994; 269: 26431-26437.

[8] Iwasaki M, Fues H, Katayama T. Histological and Endocrinological investigations of cyclosporine effects on the rat testis. Andrologia 1995; 27: 185-189.

[9] Zhang Z, Renfree MB, Short RV. Successful intra and interspecific male germ cell transplantation in the rat. Biol Reprod 2003; 68: 961-967.

[10] Robson D. Review of the properties and mechanisms of action of cyclosporine with an emphasis on dermatological therapy in dogs, cats and people. Vet Rec 2003; 152: 768-772.

[11] Seethalakshmi L, Menon M, Malhotra RK, Diamond DA. Effect of cyclosporine A on male reproduction in rats. J Urol 1987; 138: 991-995.

[12] Chen C, Scott MH, Wolf PL, Moossa AR, Lee S. Histometric investigations of the effect of cyclosporin A on the testicular tissue of rats. Exp Mol Pathol 1988; 49: 185-195.

[13] ivas M, Agarwala S, Datta Gupta S, Das SN, Jha P, Misro MM, Mitra DK. Effect of cyclosporine on fertility in male rats. Pediatr Surg Int 1998; 13: 388-391.

[14] Turk G, Atessahin A, Sonmez M, Yuce A, Ceribasi AO. Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats. Theriogenology 2007; 67: 778-785.

[15] Lee CH, Chai SE. The effects of cyclosporine A on testes of rats. Korean J Urol 1991; 32: 536-544.

[16] Parra T, de Arriba G, Conejo JR, Cantero M, Arribas I, Rodríguez-Puyol D, et al. Cyclosporine increases local glomerular synthesis of reactive oxygen species in rats: Effect of vitamin E on cyclosporine nephrotoxicity. Transplantation 1998; 66: 1325-1329.

[17] Anders D, Cascales M. Novel mechanism of vitamin E protection againt cyclosporineA cytotoxicity in cultured rat hepatocytes. Biochem Pharmacol 2002; 64: 267-276.

[18] Iwasaki M, Fues H, Kazama T, Katayama T. Effects of cyclosporine A on male reproduction in rats. Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi 1991: 82: 1059-1066.

[19] Jie Z, Bing-Yan Z. A study of the toxic effects of cyclosporine on testis and adrenal glands in male rats. Transplant Proc 1994; 26: 3517-3525.

[20] Seethalakshmi L, Flores C, Carboni AA, Bala R, Diamond DA, Menon M. Cyclosporine: Its effects on testicular function and fertility in prepubretal rat. J Androl 1990; 11: 17-24.

[21] Hisatomi A. Effects of cyclosporin A on spermatogenesis of rat. Toxicology 1996; 19: 338-344.

[22] Seethalakshmi L, Flores C, Carboni AA, Menon M. Quantitative maintenance of spermatogenesis in cyclosporine treated rats by exogenous administration of testosterone propionate. J Androl 1990; 11: 491-497.

Archive of SID

www.SID.ir

Protective effects of vitamin E on cyclosporineA-induced toxicity in rat testis

Hamidreza Sameni (Ph.D)[*1,2], Saeed Haghighi (M.Sc)[1,2], Mohammadhasan Tabrizi Amjad (M.Sc)[2]
1 - Research Center of Physiology Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
2 - Dept. of Anatomical Sciences, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

(Received: 7 Oct 2010 Accepted: 3 Apr 2011)

Introduction: Cyclosporine A (CsA) as an immunosuppressive drug which widely used in organ transplantation and autoimmune diseases. This drug is caused many injuries and cell cytotoxic of the body organs such as reproductive organs. The aim of this study was to investigate the possible protective effects of vitamin E (Vit E) against CsA-induced damages in rat testis.

Material and Methods: 40 adult male wistar rats were divided into 5 groups: control (without any intervention), placebo (received only pure olive oil), test 1 (CsA+olive oil, 30 mg/kg), test 2 (Vit E, 100 mg/kg) and test 3 (CsA+Vit E, with the same dose). All animal received drugs for three weeks daily by oral gavages. Following, the testis were fixed and sections stained with Haematoxylin & Eosin and Trichrome Masson. Then with using a microscope equipped with a scaled ocular micrometer and image analysis software were histomorphometry.

Results: This study showed that CsA caused severe degenerative changes in testicular tissue include decreased seminiferous tubules diameter, seminiferous epithelium thickness. Also, the number of spermatogonia, primary spermatocyte, spermatozoa, and sertoli and leydig cells significantly decreased throughout the experiment. These changes are lead to turbulence and atrophy seminiferous epithelium and delay in spermatogenesis. Treatment with vitamin E minimized the adverse effects of CsA on testis structure and spermatogenesis.

Conclusion: These results suggest that vitamin E has a protective effect against CsA-induced testicular toxicity in male rat.

Keywords: Cyclosporine, Vitamin E, Testis, Spermatogenesis, Rats

***** Corresponding author. Tel: +98 231 3354170-3 Fax: +98 231 3354161
hrsameni@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir