

## اثرات محافظتی کروسین بر بافت بیضه در موش‌های سوری بالغ تحت درمان با سیکلوفسفامید

زهرا بختیاری\*، رسول شهروز، عباس احمدی، فرهاد سلطانعلی نژاد

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۶/۲۶

### چکیده

**زمینه و هدف:** عوارض جانبی حاصل از سیکلوفسفامید باعث کاهش باروری و حتی عقیمی در افراد تحت درمان با این دارو می‌شود. هدف این مطالعه بررسی اثرات محافظتی کروسین بر بافت بیضه در موش‌های سوری بالغ تحت درمان با سیکلوفسفامید بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، ۱۵ سر موش سوری نر بالغ ۲۵-۲۰ گرمی در ۳ گروه مساوی شامل؛ گروه کنترل با دریافت روزانه ۰/۱ سی‌سی سرم فیزیولوژی، گروه شم کنترل با دریافت ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم سیکلوفسفامید هفته‌ای یک بار و گروه تجربی با دریافت روزانه ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروسین به همراه سیکلوفسفامید به صورت داخل صفاقی تقسیم شدند، پس از ۵ هفته تزریق، ظرفیت آنتی‌اکسیدانسی تام سرم خون آنها اندازه‌گیری شد و بیضه‌ها جهت انجام کارهای شیمی‌بافت، بافت‌شناسی و ریخت‌سنجی مورد مطالعه قرار گرفتند. داده‌ها با آزمون آماری آنالیز واریانس تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** مطالعه ریخت‌سنجی نشان داد که میانگین ضخامت اپی‌تلیوم، قطر لوله‌های منی‌ساز و تعداد سلول‌های لیدیک در گروه تجربی به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شم کنترل بود ( $p < 0/05$ ). میانگین پراکندگی ماست سل‌ها در گروه شم کنترل نسبت به گروه تجربی افزایش معنی‌داری داشت ( $p < 0/05$ ). هم‌چنین افزایش واکنش پاس مثبت، آلکالین فسفاتاز و دانه‌های چربی در سیتوپلاسم سلول‌های لیدیک در گروه شم کنترل نسبت به سایر گروه‌ها مشاهده شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانسی تام در گروه شم کنترل دارای کاهش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل و تجربی بود ( $p < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** به طور کلی کروسین توانست به میزان قابل توجهی از عوارض ناشی از تجویز سیکلوفسفامید جلوگیری نماید.

**واژه‌های کلیدی:** بیضه، سیکلوفسفامید، کروسین، بافت‌شناسی، شیمی‌بافت، موش سوری

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

Email: sara-bakhtiari1@yahoo.com

## مقدمه

اثرات جانبی سیکلوفسفامید بر روی دستگاه تناسلی، در این مطالعه از کروسین که عصاره‌ی زعفران است و خاصیت از بین بردنده‌ی رادیکال‌های آزاد را دارد (۱۰)، استفاده گردید. کروسین هم‌چنین دارای اثرات ضد توموری، ضد درد، ضدالتهاب، ضد تشنج، و ضد افسردگی در حیوانات و انسان می‌باشد (۱۴-۷). در مطالعه دیگری اثرات ضد آترواسکلروز کروسین در بلدرچین‌ها مشخص شده است (۱۵).

از آنجا تا به حال مطالعه‌ای در زمینه تأثیر کروسین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت در کاهش عوارض جانبی سیکلوفسفامید بر روی بافت بیضه صورت نگرفته است، در این مطالعه، اثر محافظتی کروسین بر بهبود پارامترهای باروری در بیماران تحت درمان با سیکلوفسفامید بررسی شد.

## روش بررسی

در این مطالعه تجربی از ۱۵ سر موش سوری نر بالغ ۲۵-۲۰ گرمی در ۳ گروه شامل؛ گروه کنترل با دریافت روزانه ۰/۱ سی‌سی سرم فیزیولوژی، میلی‌گرم بر کیلوگرم، گروه شم کنترل با دریافت ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم سیکلوفسفامید هفته‌ای یک‌بار و گروه تجربی نیز با دریافت روزانه ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروسین به همراه ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم سیکلوفسفامید هفته‌ای یک بار، استفاده شد. پس از طی ۵ هفته دوره‌ی درمان، موش‌ها به وسیله تزریق کتامین با دوز ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم ابتدا بی‌هوش شده و از ورید گردنی آن‌ها جهت تهیه سرم برای

امروزه نگرانی رو به رشدی در مورد پیامدهای اثرات سوء مواد شیمیایی بر سیستم تولید مثلی، توان باروری و رشد و تکامل جنین به وجود آمده است. شیمی‌درمانی به عنوان یکی از عوامل ایجاد استرس اکسیداتیو در بدن، سبب بروز آسیب در روند اسپرماتوژنز، کاهش تولید اسپرماتوزوئیدها، افزایش تعداد اسپرماتوزوئیدهای ناهنجار و نتیجتاً کاهش باروری می‌شود (۲ و ۱). سیکلوفسفامید که یکی از رایج‌ترین داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی است، علاوه بر اثرات سودمند بر روی بافت‌های سرطانی، با برهم زدن تعادل رداکس در بافت‌ها موجب ایجاد اختلالات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ناشی از استرس اکسیداتیو می‌شود (۵-۳). گزارش‌هایی مبنی بر این که سیکلوفسفامید باروری را در انسان کاهش می‌دهد منتشر شده است (۲ و ۱). مردانی که به مدت ۴ ماه یا بیشتر تحت درمان با این دارو قرار گرفته‌اند، وضعیت‌های متغیری از الیگواسپرمی یا آواسپرمی را تجربه کرده‌اند (۶).

اگرچه مکانیسم‌های بیوشیمیایی و سلولی ایجاد مسمومیت تولید مثلی به وسیله سیکلوفسفامید به خوبی شناخته نشده است، ولی بررسی‌های بی‌شمار صورت گرفته نشان داده اند که این دارو با تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در داخل سلول ایجاد استرس اکسیداتیو می‌کند (۵-۳). با توجه به اهمیت موضوع باروری در انسان و به منظور کاهش

کرایوستات مدل برای ساخت انگلیس از آن‌ها مقاطع ۱۰ میکرومتری تهیه و به روش اوایل-رد - او، رنگ آمیزی و دانه‌های حاوی چربی به رنگ قرمز روشن دیده شدند (۱۶ و ۱۷). همچنین در مقاطع ۱۰ میکرومتری تهیه شده با دستگاه کرایوستات که به روش آلکالین فسفاتاز رنگ آمیزی شده بودند، دانه‌های حاوی این آنزیم به رنگ قهوه‌ای تیره مشاهده گردیدند (۱۸). مقاطع پارافینی برای مطالعه ترکیبات کربوهیدراته به وسیله روش پریودیک اسید شیف (PAS) رنگ آمیزی شده و دانه‌های پاس مثبت به رنگ قرمز براق دیده شدند (۱۹).

داده‌های به دست آمده از مطالعات ریخت سنجی و اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام سرم به وسیله نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس و آزمون دانکن تجزیه و تحلیل شدند.

#### یافته‌ها

مشاهدات بافت شناسی نشان از حالت ادماتوز در بافت بینابینی و فاصله گرفتن لوله‌های منی‌ساز از یکدیگر، همچنین از هم گسیختگی سلول‌های سری اسپرما توژنز و کاهش ارتفاع اپی‌تلیوم زایگر در بیشتر لوله‌های منی‌ساز، در گروه دریافت کننده سیکلوفسفامید نسبت به گروه کنترل داشت که این شرایط در گروه تجربی به وضوح بهبود یافت (تصویر ۱).

انجام آزمایش تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام خون‌گیری به عمل آمد و سپس آسان‌کشی شدند. نمونه‌های سرمی پس از ۲ بار سانتریفیوژ در دور ۳۰۰۰ میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام (TAOC)<sup>(۱)</sup> آنها به روش بنزی اندازه‌گیری شد. پس از باز کردن محوطه شکمی حیوانات، بیضه راست در داخل فرمالین سرم فیزیولوژی ۱۰ درصد قرار داده شد و پس از ثبوت نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت، مراحل پاساژ بافتی آغاز و از بلوک‌های پارافینی برش‌های ۷-۶ میکرومتری تهیه گردید. سپس برش‌ها برای مطالعات بافت‌شناسی و ریخت سنجی بافت پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین، با استفاده از میکروسکوپ نوری الُمپوس مدل BH-2 و عدسی مدرج که قبلاً کالیبره شده بود، میانگین ضخامت اپی‌تلیوم زایگر و قطر لوله‌های منی‌ساز در آنها بر حسب میکرومتر اندازه‌گیری شد و با استفاده از عدسی مشبک، شمارش سلول‌های لیدیک در سطح ۱ میلی‌متر مربع انجام شد. مطالعه بافت‌شناسی نمونه‌ها به منظور بررسی بافت بینابینی از نظر ادم و پرخونی و بررسی لوله‌های منی‌ساز از نظر شکل ظاهری مانند، گسیختگی و تخریب اپی‌تلیوم زایگر صورت گرفت و از رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو، برای مطالعه میانگین پراکندگی ماست سل‌ها استفاده گردید. بیضه‌های چپ جهت مطالعات شیمی بافت به دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند و سپس به منظور بررسی وجود چربی غیر اشباع، ابتدا در فرمالین بافری ۱۰ درصد قرار گرفتند و بعد با دستگاه

1- Total Antioxidant of Capacity (TAOC)

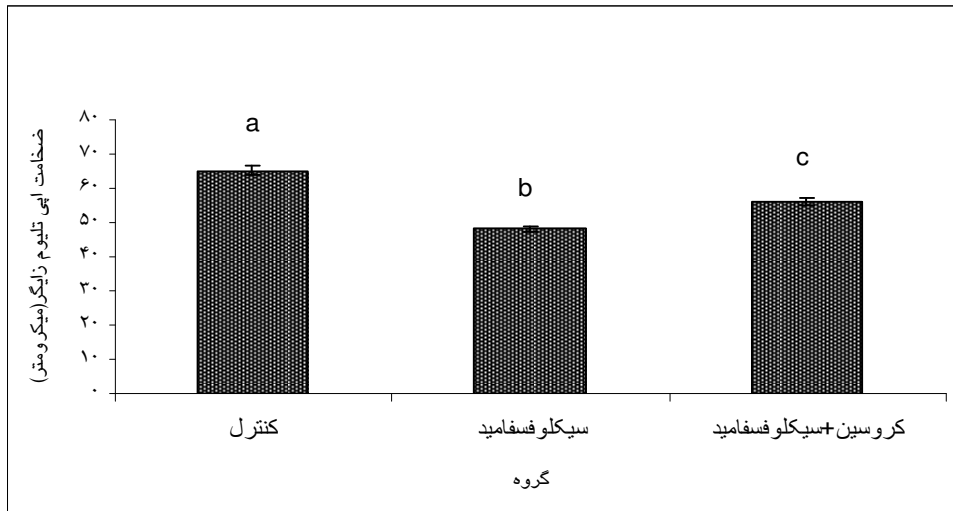
بینابینی بیضه گروه شم کنترل به صورت دانه‌های ریز قهوه ای به وضوح مشاهده گردید، اما این واکنش در گروه تجربی به میزان قابل توجهی کاهش نشان داد (تصویر ۴). در رنگ آمیزی اوایل رد - او دانه‌های چربی در سیتوپلاسم سلول‌های لیدیک در گروه شم کنترل نسبت به سایر گروه‌ها افزایش داشت و همچنین تجمع چربی در سیتوپلاسم سلول‌های سری اسپرما توژنز در مجاور دیواره داخلی لوله‌های منی‌ساز در گروه شم کنترل مشاهده گردید (تصویر ۵).

میانگین پراکنندگی سلول‌های لیدیک نیز در گروه شم کنترل نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داد، ولی میانگین تعداد سلول‌های لیدیک در گروه دریافت کننده کروسین، نسبت به گروه شم کنترل افزایش داشت، با این حال به طور معنی‌دار کمتر از گروه کنترل بود ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۴). همچنین میزان ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام (TAOC) در گروه شم کنترل نسبت به گروه کنترل و تجربی کاهش معنی‌داری را نشان داد، ولی در گروه تجربی، ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۵).

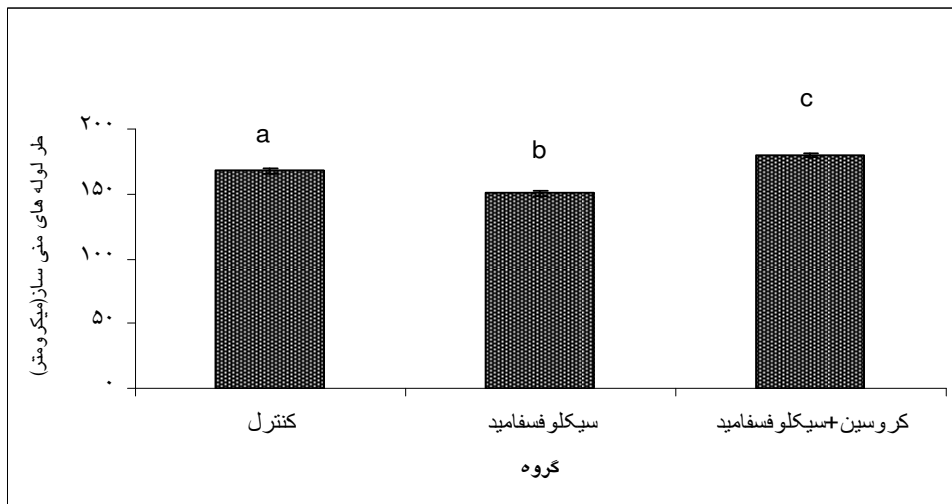
در بررسی‌های ریخت سنجی بافت نیز ضخامت اپیتلیوم و قطر لوله‌های منی‌ساز در گروه شم کنترل دارای کاهش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل و تجربی بود، در حالی که اختلاف دو گروه کنترل و تجربی نیز معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ) (نمودارهای ۱ و ۲).

در رنگ آمیزی تولوئیدین بلو پراکنندگی ماست سل‌ها با سیتوپلاسم پر از دانه‌های بنفش تیره که اغلب روی هسته را نیز پوشانده‌اند در کپسول بیضه مشاهده گردیدند، این سلول‌ها در بافت بینابینی بیضه مشاهده نشدند (تصویر ۲). میانگین تعداد ماست سل‌ها در گروه شم کنترل به میزان معنی‌داری از گروه کنترل بیشتر بود، در حالی که کروسین به طور معنی‌دار توانسته میانگین تعداد این سلول‌ها را کاهش دهد ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۳).

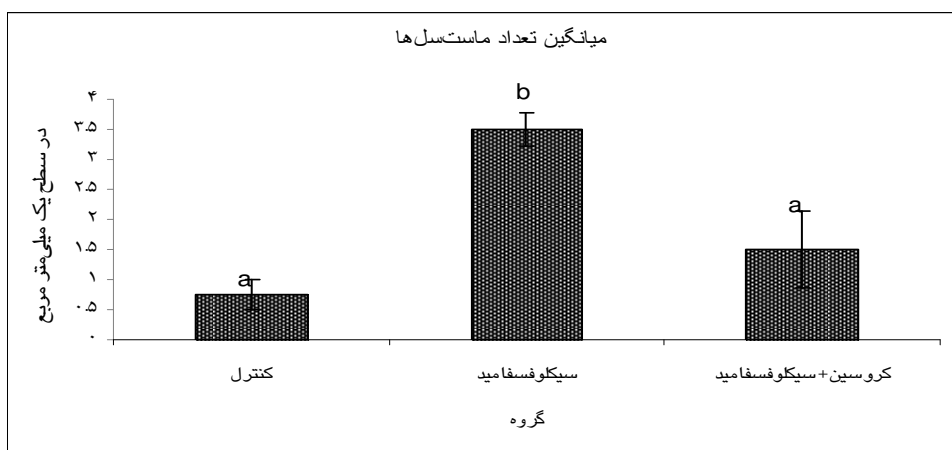
مشاهدات شیمی بافت، در رنگ آمیزی پاس، حاکی از افزایش واکنش پاس مثبت در سلول‌های لیدیک و همچنین سلول‌های مجاور حفره داخلی در لوله‌های منی‌ساز گروه شم کنترل نسبت به گروه کنترل بود، که در گروه تجربی، واکنش پاس مثبت در سلول‌های لیدیک و سلول‌های مجاور حفره داخلی در لوله‌های منی‌ساز نسبت به گروه شم کنترل کاهش یافت (تصویر ۳). واکنش آکالین فسفاتاز در بافت



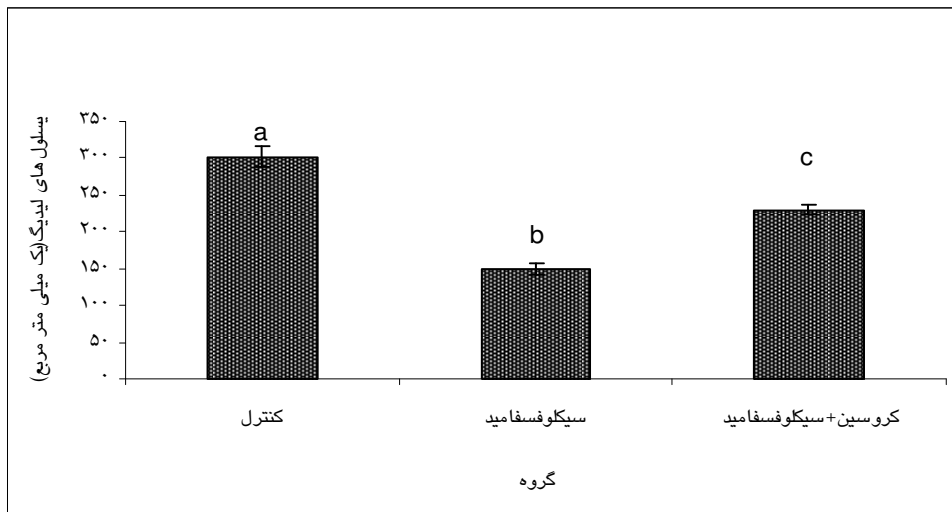
نمودار ۱: میانگین ضخامت اپی تلیموم زایگر در لوله‌های منی‌ساز بیضه، (حروف غیر متشابه به نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه‌ها می‌باشد) ( $P < 0.05$ ).



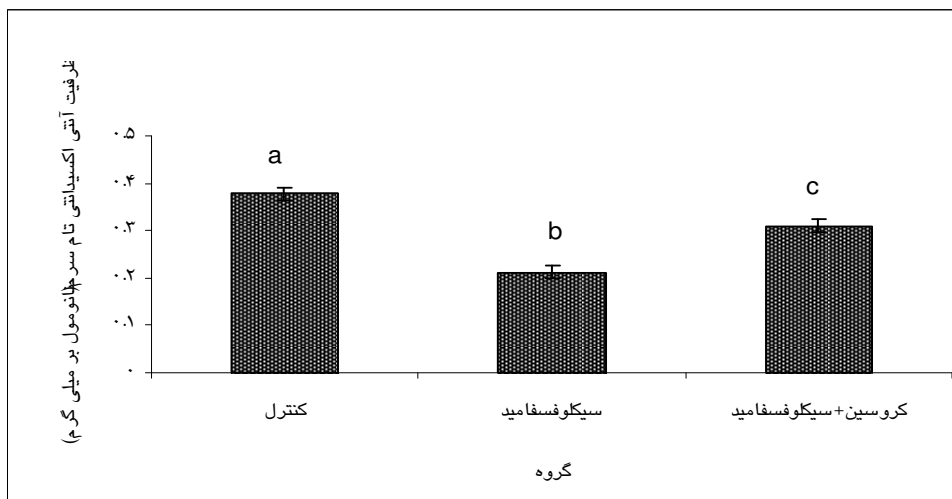
نمودار ۲: میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز بیضه (حروف غیر متشابه به نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه‌ها می‌باشد) ( $P < 0.05$ ).



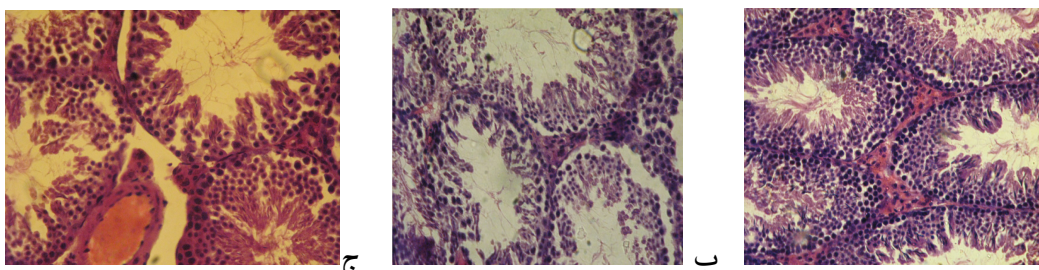
نمودار ۳: میانگین تعداد ماست سل‌ها در کیسول بیضه، (حروف غیر متشابه به نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه‌ها می‌باشد) ( $P < 0.05$ ).



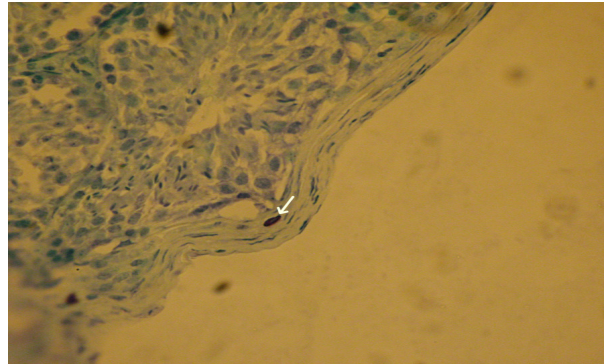
نمودار ۴: میانگین تعداد سلول‌های لیدیک در بافت بینابینی بیضه، (حروف غیر متشابه به نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه‌ها می‌باشد) ( $P < 0.05$ ).



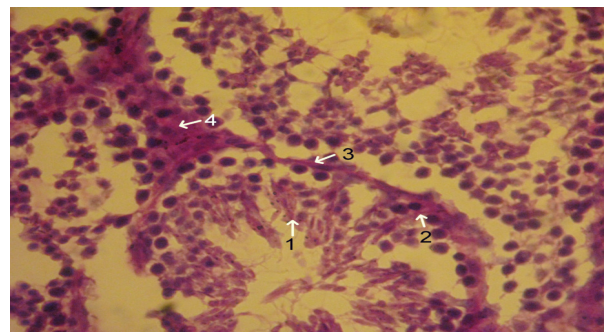
نمودار ۵: ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام سرم خون، (حروف غیر متشابه به نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه‌ها می‌باشد) ( $P < 0.05$ ).



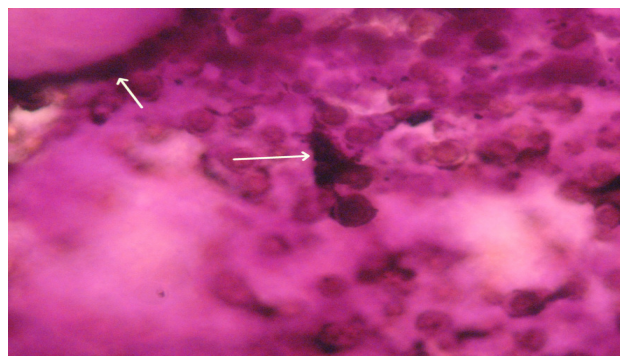
تصویر ۱: مقایسه مقاطع لوله‌های منی‌ساز مربوط به گروه‌های مختلف، الف: گروه کنترل، بافت بینابینی در بین لوله‌های منی‌ساز و اپی‌تلیوم زایگر لوله‌های منی‌ساز دارای ضخامت قابل توجهی می‌باشد. ب: مقاطع لوله‌های منی‌ساز مربوط به گروه کنترل شم. ضخامت بافت بینابینی و اپی‌تلیوم زایگر به طور مشخص کاهش یافته و سلول‌های اپی‌تلیوم زایگر دارای حالت گسیخته شده می‌باشد. ج: مقاطع لوله‌های منی‌ساز مربوط به گروه تجربی. تخریب حاصل از تجویز سیکلوفسفامید به طور مشخص با کروسین جلوگیری شده است. (رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین، بزرگ نمایی  $400\times$ ، میکروسکوپ نوری)



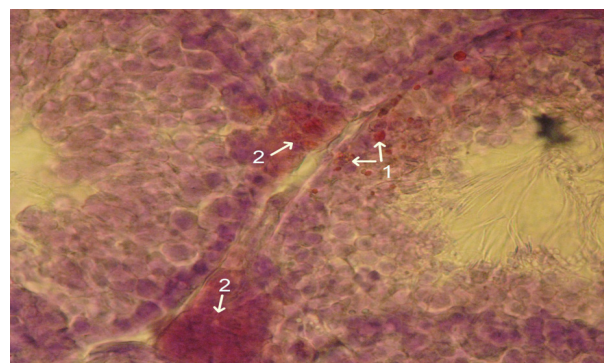
تصویر ۲: مقطع بافتی نشان دهنده ماست سل (فلش) در کپسول بیضه. (رنگ آمیزی تولوئیدین بلو بزرگ نمایی  $400\times$ ، میکروسکوپ نوری)



تصویر ۳: مقطع بافتی نشان دهنده واکنش PAS در نواحی شماره گذاری شده بافت بیضه گروه تجربی؛ ۱- سلول‌های سری اسپرماتوژنز. ۲- سلول‌های سری اسپرماتوژنز اپی تلیوم زایگر. ۳- پارین لوله منی‌ساز. ۴- سلول‌های لیدیگ. (روش رنگ آمیزی PAS. بزرگ نمایی  $400\times$ ، میکروسکوپ نوری)



تصویر ۴: مقطع بافتی نشان دهنده نواحی دارای آنزیم آلکالین فسفاتاز به وسیله فلش در بافت بینابینی و اپی تلیوم زایگر در گروه کنترل شم. رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز. بزرگ نمایی  $400\times$ ، میکروسکوپ نوری)



تصویر ۵: مقطع بافتی نشان دهنده واکنش چربی در نواحی شماره گذاری شده؛ ۱- سلول‌های سری اسپرماتوژنز. ۲- سلول‌های لیدیگ در بافت بینابینی. (رنگ آمیزی اوئل رد او، بزرگ نمایی  $400\times$ ، میکروسکوپ نوری)

## بحث

مسمومیت دستگاه تناسلی یکی از اصلی‌ترین اثرات جانبی شناخته شده مصرف سیکلوفسفامید در انسان و حیوان می‌باشد (۱). از سوی دیگر، از آن جایی که اثرات سیتوتوکسیک سیکلوفسفامید سلول‌هایی که سریع تکثیر می‌شوند را هدف قرار می‌دهد، بیضه جایگاه ویژه‌ای برای اثرات مخرب این دارو می‌باشد (۲۰). مطالعات صورت گرفته، نقش سیکلوفسفامید در بروز اولیگواسپرمی و آزواسپرمی (۲۱) و نیز حذف چرخه‌های اسپرماتوزنیک را در مردان بالغ تحت درمان با این دارو تأیید کرده است (۱). این مطالعه برای تعدیل اثرات ثانویه ناشی از استرس اکسیداتیو اعمال شده به وسیله سیکلوفسفامید با استفاده از عصاره زعفران (کروسین) انجام گرفت.

در بررسی‌های ریخت‌سنجی بافت ضخامت اپی‌تلیوم زایگر، قطر لوله‌های منی‌ساز، تعداد سلول‌های لیدینگ در گروه شم کنترل دارای کاهش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل و تجربی بود، اما تغییرات بافت‌شناسی، ریخت‌سنجی بافت، شیمی بافت و سرمی در این مطالعه نشان می‌دهد که سیکلوفسفامید باعث بروز سمیت تولید مثلی از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود، که با تجویز هم‌زمان کروسین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت، این اثر سمی‌دارو تخفیف پیدا می‌کند. پتانسیل و توانایی سیکلوفسفامید و متابولیت سمی آن، آکرولئین، در تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و ایجاد

پراکسیداسیون چربی و در نتیجه بروز استرس اکسیداتیو در رت، که قبلاً گزارش شده است (۲۲)، خود دلیلی بر کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام سرم در آزمایش TAOC انجام گرفته بر روی سرم حیوانات گروه تحت درمان با سیکلوفسفامید می‌باشد. در مطالعه حاضر نشان داده شد که ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی تام در گروه شم کنترل نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌دار کاهش یافته و کروسین موجب محافظت حیوان در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از درمان با سیکلوفسفامید گردید. هم‌چنین استرس اکسیداتیو با فرآیند آپوپتوزیس در ارتباط بوده و این عارضه در بیضه مردان سالم و نیز مردان دچار آزو اسپرمی غیرانسدادی نیز گزارش شده است (۶). از طرفی حساسیت سلول‌های پس میوزی به سیکلوفسفامید ب‌طور اختصاصی بیشتر از سایر سلول‌های جنسی است (۲۳)، پس می‌توان نتیجه گرفت که آپوپتوز و حساسیت سلول‌های پس میوزی، به عنوان دو عامل مهم در کاهش ضخامت اپیتلیوم زایگر و قطر لوله‌های منی‌ساز در گروه سیکلوفسفامید می‌باشد، در حالی که تجویز کروسین هم‌زمان با سیکلوفسفامید، به طور معنی‌دار موجب خنثی شدن اثرات سمی‌دارو گردید. شیمی درمانی می‌تواند یک اثر توکسیک مستقیم بر روی سلول‌های لیدینگ داشته باشد، اما شواهدی مبنی بر اثر غیر مستقیم آسیب‌دیدگی سلول‌های منی‌ساز بر عملکرد منفی سلول‌های لیدینگ گزارش شده است (۲۴)، که خود می‌تواند دلیلی بر کاهش تعداد سلول‌های لیدینگ در گروه شم کنترل



منجر به واکنش منفی آنها در برابر رنگ آمیزی PAS می‌شود. در یک مطالعه مشخص شد که فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و اسید فسفاتاز در اعضای تولید مثلی مانند بیضه به اسپرماتوزن مرتبط می‌شود (۳۳). از طرفی به دلیل ارتباط بین دژنراسیون سلول‌های زایگر بیضه و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در بیضه چپ رت‌های دارای عارضه واریکوسل مشخص شد که فعالیت این آنزیم با دژنراسیون سلول‌های زایگر بیضه افزایش می‌یابد (۳۴).

#### نتیجه‌گیری

به طور کلی در این مطالعه نشان داده شد که سیکلوفسفامید به علت ایجاد استرس اکسیداتیو موجب کاهش تکثیر سلول‌های سری اسپرماتوزن، میانگین تعداد سلول‌های لیدیک و ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام سرم شده که تجویز کروسین توانست به طور معنی دار اثرات مخرب سیکلوفسفامید را جبران نماید، ولی این اثر جبرانی در اغلب موارد به اندازه گروه کنترل نبود.

#### تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد بافت شناسی مقایسه ای بود که با حمایت بخش بافت‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انجام شد.

باشد. از طرفی کاهش تعداد و عملکرد میانگین سلول‌های لیدیک، منجر به کاهش هورمون تستوسترون و اسپرماتوزن گردیده و آن نیز می‌تواند منجر به کاهش ارتفاع اپی تلیوم زایگر شود (۲۵).

بررسی شیمی‌بافتی بیضه‌ها در موش‌های درمان شده با سیکلوفسفامید، افزایش قابل ملاحظه ای را در تعداد قطرات چربی نسبت به گروه کنترل و تجربی نشان داد. گزارشی نشان می‌دهد که تغییر در اندازه و مقدار ذرات چربی در مقطع عرضی لوله‌های منی‌ساز با میزان تخریب سلول‌های جنسی و تجمع چربی مصرف نشده برای بیوسنتز هورمون‌های استروئیدی در ارتباط است (۲۶). نتایج چندین مطالعه نشان می‌دهد که افزایش در تعداد ماست سل‌های بیضه با اختلالات اسپرماتوزن همراه بوده (۲۷)، و همچنین چندین مطالعه دیگر ارتباط بین افزایش تعداد ماست سل‌ها با ناباروری را نشان می‌دهند (۲۷). استرس نیتروزاتیو ناشی از سیکلوفسفامید به واسطه مکانیسم‌های مختلفی مثل تحریک آپوپتوز در سلول‌های اندوتلیال (۲۸ و ۲۹) و سلول‌های عضلانی صاف عروق خونی (۳۰ و ۳۱) موجب افزایش نفوذپذیری عروق خونی و ادم بافتی می‌شود. از آنجا که تغییرات دژنراتیو در بافت بیضه موجب کاهش انتقال دهنده‌های گلوکز می‌شود (۳۲)، لذا سیکلوفسفامید با آسیب زدن به این انتقال دهنده‌ها موجب اختلال در انتقال گلوکز به داخل لوله‌های منی‌ساز و سلول‌های رده اسپرماتوزن که فعالیت میتوزی بالایی دارند، می‌شود، که این امر در نهایت

## REFERENCES

1. Howells, Shalet S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998; 27:927-43.
2. Chapman RM. Gonadal injury resulting from chemotherapy. *Am J Ind Med* 1983; 4:149-61.
3. Das UB, Mallick M, Debnath JM, Ghosh D. Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide-induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. *Asian J Androl* 2002; 4:201-7.
4. Ghosh D, Das UB, Ghosh S, Mallick M, Debnath J. Testicular gametogenic and steroidogenic activities in cyclophosphamide treated rat: A correlative study with testicular oxidative stress. *Drug Chem Toxicol* 2002; 25:281-92.
5. Manda K, Bhatia AL. Prophylactic action of melatonin against cyclophosphamide-induced oxidative stress in mice. *Cell Biol Toxicol* 2003; 19:367-72.
6. Tesarik, Martinez F, Rienzi L, Iacobelli M, Ubaldi F, Mendoza C, Greco E. In-vitro effects of FSH and testosterone with drawal on caspase activation and DNA fragmentation in different types of human seminiferous epithelium. *Hum Reprod* 2002; 17:1811-9.
7. Nair SC, Pannikar B, Panikar KR. Antitumour activity of saffron (*Crocus sativus*). *Cancer Lett* 1991; 57: 109.
8. Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M, Fernandez JA. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Lett* 1996; 100: 23.
9. Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Exp Biol Med* 2002; 227: 20.
10. Ríos JL, Recio MC, Giner RM, Mánñez S. An Update Review of Saffron and its Active Constituents. *Phytother Res* 1996; 10: 189.
11. Hosseinzadeh H, Younesi H. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacol* 2002; 2: 7.
12. Hosseinzadeh H, Khosravan V. Anticonvulsant effects of aqueous and ethanolic extracts of *Crocus sativus* L. stigmas in mice. *Arch Intern Med* 2002; 5: 44.
13. Karimi G, Hosseinzadeh H, Khaleghpanah P. Study of antidepressant effect of aqueous and ethanolic of *Crocus sativus* in mice. *Iran J Basic Med Sci* 2001; 4-11.
14. Akhondzadeh S, Fallah-Pour H, Afkham K, Jamshidi AH, Khalighi-Cigaroudi F. Comparison of *Crocus sativus* L. and imipramine in the treatment of mild to moderate depression: a pilot double-blind randomized trial. *BMC Comp Alter Med* 2004; 4:12.
15. Shu-Ying H, Zhi-Yu O, Fu-Tian T, Na W, Guang-Lin X, Liang S. Effect of crocin on experimental atherosclerosis in quails and its mechanisms 2005; 77:907-921.
16. Sheehan HL, Storey GW. An improved method of staining leukocyte granules with Sudan Black B. *J Pathol Bacteriol* 1947; 59:336.
17. Collins K, Geisinger K, Wanger P, Blackburn K, Washburn L, Block S. The cytologic evaluation of lipid-laden alveolar macrophages as an indicator of aspiration pneumonia in young children. *Arch Pathol Lab Med* 1995; 119:229-31.
18. Bakst MR, Akuffo V, Trefil P, Brillard JP. Morphological and histochemical characterization of the seminiferous epithelial and Leydig cells of the turkey. *Animal Reproduction Science* 2007; 97: 303-13.
19. Lee G, Luna HT. Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, McGraw-Hill Book Company: USA; 1968; 158-9.
20. Elangovan N, Chiou, TJ, Tzeng WF, Chu ST. Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. *Toxicology* 2006; 222: 60-70.
21. Qureshi MS, Pennington JH, Goldsmith HJ, Cox PE. Cyclophosphamide therapy and sterility. *Lancet* 1972; 2:1290-1.
22. Lear L, Nation RL, Stupans I. Effects of cyclophosphamide and adriamycin on rat hepatic microsomal glucuronidation and lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1992; 44:747-53.
23. Qiu J, Hales BF, and Robaire B. Effects of chronic low-dose cyclophosphamide exposure on the nuclei of rat spermatozoa. *Biol Reprod* 1995; 52:33-40.
24. Howells SJ, Radford JA, Ryder WDJ, Shalet SM. Testicular function after cytotoxic chemotherapy: Evidence of Leydig cell insufficiency. *Journal of Clinical Oncology* 1999; 17:1493-8.
25. Rezvandarfar MA, Sadrkhanlou RA, Ahmadi A, Shojaei-sadeh H, Mohammadirad A, Salehnia A, et al. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. *Hum Exp Toxicol* 2008; 27(12): 901-10.

26. Qin DN, Lung MA. Studies on the relationship between testicular capsule and sperm transport in the rat testis. *Asian J Androl* 2000; 2:191-8.
27. Roaiah MM, Khatab H, Mostafa T. Mast cells in testicular biopsies of azoospermic men *Andrologia* 2007; 39:185-9.
28. Mihm MJ, Jing L, Bauer JA. Nitrotyrosine causes selective vascular endothelial dysfunction and DNA damage. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36:182-7.
29. Dickout JG, Hossain GS, Pozza LM, Zhou J, Lhotak S, Austin RC. Peroxynitrite causes endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human vascular endothelium: implications in atherogenesis. *ArterioclerThrombVascBiol* 2005; 25:2623-9.
30. Li J, Su J, Li W, Altura BT, Altura BM. Peroxynitrite induces apoptosis in canine cerebral vascular muscle cells: possible relation to neurodegenerative diseases and strokes. *NeurosciLett* 2003; 350:173-7.
31. Li J, Li W, Su J, Liu W, Altura BT, Altura BM. Peroxynitrite induces apoptosis in rat aortic smooth muscle cells: possible relation to vascular diseases. *Exp Biol Med* 2004; 229:264-9.
32. Farooqui SM, Al-Bagdadi F, O'Donnell JM, Stout R. Degenerative changes in spermatogonia are associated with loss of glucose transporter (Glu 3) in abdominal testis of surgically induced unilateral cryptorchidism in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236:407-12.
33. Mann T. *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*. Methuen, London: 1964; 493.

# Protective effects of crocin on testes of adult cyclophosphamide treated mice

Bakhtiary Z<sup>\*</sup>, Shahrooz R, Hmadi A, Soltanolinejad F

Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Received: 21 Aug 2013

Accepted: 17 Sep 2013

## Abstract

**Background & aim:** The side effect of cyclophosphamide is to reduce fertility or even sterility in men treated with these medications. This study was performed to improve these side effects.

**Methods:** In the present experimental study, 15 male mice (20-25 g) were divided into three groups. The control group was treated with 0.1cc of saline daily. The sham group received 15 mg/kg cyclophosphamide once a week and the experimental group was treated with 200 mg/kg Crocin intraperitoneally along with cyclophosphamide. Five weeks after injection total antioxidant capacity of serum was measured. The testes were studied for histological and morphometric parameters. The collected data was analyzed by ANOVA.

**Results:** Histomorphometrical study indicated that epithelial thickness, diameter of seminiferous tubules and Leydig cells of experimental group was significantly greater than sham controls ( $p < 0.05$ ). Mean distribution of mast cells in the sham group compared to the experimental group showed a significant increase ( $p < 0.05$ ). Additionally, positive PAS reaction, alkaline phosphatase and vegetable fat in the cytoplasm of Leydig cells of sham control were observed, whereas in the other groups not seen. In addition, total antioxidant capacity of sham group decreased significantly compared to the control and experimental groups with the sham control and experimental groups ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** in general Crocin could significantly prevent the side effects of cyclophosphamide therapy.

**Key words:** Testes, Cyclophosphamide, Crocin, Histology, Histochemistry, Mice

---

**\*Corresponding Author:** Bakhtiari Z, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

**Email:** sara-bakhtiari1@yahoo.com